

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Lilian Leis

**Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 spermatogoonide spetsiifilise *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>*  
konditsionaalse hiireliini tekitamine ning analüüs**

Magistritöö geenitehnoloogias

30 EAP

Juhendajad: PhD Tambet Tõnissoo  
MSc Riho Meier

TARTU 2016

## INFOLEHT

### **Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 spermatogoonide spetsiifilise *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* konditsionaalse hiireliini tekitamine ning analüüs**

Valk RIC8 on molekulaarne signaali võimendaja, mis toimib guaniini nukleotiidivahetusfaktorina G-valkude  $\alpha$ -alaühikutele. Käesolevas töös uuriti RIC8 rolli spermatogeneesis ja selle mõju viljakusele kasutades transgeenset spermatogoonide spetsiifilist hiireliini. Saadud tulemustest selgus, et RIC8 puudus spermidest ei mõjutanud noorte hiirte viljakust, küll aga vanemate loomade oma. Lisaks põhjustas RIC8 puudus häireid spermide ja testiste morfoloogias. Täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirtel suurenes tsütoplasmatilgakesega spermide osakaal ning fragmenteerunud DNA-ga spermide hulk. Vääniliste seemnetorukeste morfoloogia hindamisel esines basaalmembraani terviklikkuse häireid ja kõrvalekaldeid normaalsetest rakkude paiknemisest. Peale selle tõusis *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermatogoonide jagunemiste osakaal vanuses P7.

Märksõnad: RIC8, spermatogenees, sperm, väänilised seemnetorukesed, basaalmembraan  
CERCS kood: B350 Arengubioloogia, loomade kasv, ontogenees, embrüoloogia

### ***The role of RIC8 in spermatogenesis and the generation of spermatogonia specific conditional *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* mouse strain***

*RIC-8 is a molecular chaperon and a guanine exchange factor for a subset of G-proteins. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* transgenic mice were used to identify the function of RIC-8 in mouse spermatogenesis and its potential influence on fertility. The results indicated that older male mouse fertility was affected by RIC-8 deficiency in sperm cells. The proportion of sperms with abnormal shape (those with residual body) and fragmented DNA was increased in transgenic mice. The basement membrane of seminiferous tubules in these animals was defective and at age P7 the content of mitotic cells was higher than in controls.*

*Keywords: RIC-8, spermatogenesis, sperm cell, seminiferous tubules, basement membrane  
CERCS code: B350 Development biology, growth (animal), ontogeny, embryology*

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS .....	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE .....	9
1.1. Imetajate testised ja nende areng .....	9
1.1.1. Testiste areng .....	9
1.1.2. Sertoli rakud testiste arengus .....	9
1.1.3. Leydig'i rakud testiste arengus .....	10
1.1.4. Müoidrakud.....	11
1.1.5. Vere – testiste barjäär.....	12
1.2. Spermi ehitus .....	12
1.3. Spermatogenees .....	13
1.3.1. Spermi pre- ja postnataalne areng .....	13
1.3.2. Spermiatsioon, spermiogenees ja kapatsitatsioon .....	14
1.3.3. Hapniku reaktiivsed osakesed spermatogeneesis.....	17
1.4. G-valgud .....	18
1.5. RIC 8 – guaniini nukleotiidivahetusfaktor .....	19
1.6. <i>Stra8</i> –Cre hiireliin .....	21
2. EKSPERIMENTAALNE OSA.....	22
2.1. Töö eesmärgid.....	22
2.2. Materjal ja meetodika .....	22
2.2.1. Töös kasutatud hiireliinid.....	22
2.2.2. Hiirte ristamine .....	23
2.2.3. Hiirte genotüpiseerimine.....	24
2.2.4. <i>Stra8Cre</i> ekspressiooni kontroll $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsiooniga.....	26
2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR) .....	27
2.2.6. <i>Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup></i> hiirte fenotüübi analüüs .....	27
2.2.7. Spermi analüüs .....	31
2.2.8. Mikroskoopia, rakkude ja koelõikude pildistamine .....	35

3. TULEMUSED .....	36
3.1. <i>Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup></i> hiireliini tekitamine ja analüüs.....	36
3.1.1. <i>Stra8Cre</i> transgeeni ekspressiooni kontroll .....	36
3.1.2. <i>Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup></i> hiireliini tekitamine.....	37
3.1.3. <i>Ric8<sup>-/-</sup></i> fenotüübi analüüs .....	40
3.1.4 Testiste morfoloogia .....	43
KOKKUVÕTE .....	57
SUMMARY .....	58
TÄNUSÕNAD .....	59
KIRJANDUSE LOETELU .....	60
LIHTLITSENTS.....	74

## KASUTATUD LÜHENDID

AMH – *anti-Mullerian hormone* – anti-Mülleri hormoon

APS – *ammonium persulfate* – ammoonium persulfaat

AR – *acrosome reaction* – akrosomaalreaktsioon

AR – *androgen receptor* – androgeeni retseptor

BSA – *bovine serum albumin* – veise seerumalbumiin

BTB – *blood testis barrier* – vere testise barjäär

CG – *chorionic gonadotropin* – koorioni gonadotropiin

ES – *ectoplasmic specialization* – ektoplasmaatiline spetsialiseeritus

FLC – *fetal Leydig cell* – looteline Leydig'i rakk

FSH – *follicle-stimulating hormone* – follikuleid stimuleeriv hormoon

GDP – *guanine nucleotide dissociation inhibitor* – guaniini nukleotiidi dissotsiatsiooni inhibiitor

GPCR – *G-protein coupled receptor* – G-valkudega seotud retseptor

GTP – *Guanosine tri-phosphate* – guanosiin trifosfaat

InsI3 – *insulin-like growth factor 3* – insuliini-laadne kasvufaktor 3

LC – *Leydig cell* – Leydig'i rakk

LH – *luteinizing hormone* – luteiniseeriv hormoon

lnc – *long non-coding RNA* – pikk mittekodeeriv RNA

NFDM – *Non-Fat Dry Milk*, rasvavaba piimapulber

PBS – *phosphate buffered saline*, fosfaatpuhvriga soolalahus

PBT – fosfaatpuhvriga soolalahus + Tween 20

PFA – *paraformaldehyde* – paraformaldehüüd

PGC – *primordial germ cells* – ürgsed idurakud

RIC8 – *Resistance to Inhibitors of Cholinesterase* 8

rRNA – *ribosomal RNA* – ribosomaalne RNA

SCSA – *Sperm chromatin structure assay* – spermi kromatiini struktuuri analüüs

SDS – *sodium dodecyl sulfate*, naatriumdodetsüülsulfaat

SSC – *spermatogonial stem cells* – spermatogoonsed tüvirakud

*Stra8* – *Stimulated by retinoic acid 8*

TBC – *tubulobulbar complexes* – tubulaarsed kompleksid

TBS – *tris buffered saline*

*wt* – *wild type* – metsiktüüp

## SISSEJUHATUS

Palju on räägitud naise vanuse otsesest mõjust viljakusele. Teatakse hilisema rasedusega kaasnevaid riske ning mitmete sündroomide ja haiguste suurenenud esinemistõenäosust lastel. On näidatud, et sarnased seosed kehtivad ka meeste puhul. Lisaks kahjulikele eluviisidele avaldab mõju sperma-kvaliteedile ja viljakusele mehe vanus. Vananedes väheneb organismis testosterooni tase, sugurakkude, Sertoli ning Leydigi rakkude arvukus. Vanusega seotud muutuse seletusteks on tänaseks välja kujunenud kaks teooriat. (1) Sperme toodetakse pidevalt juurde ning seetõttu teevad spermatogoonsed tüvirakud (SSC - *spermatogonial stem cells*) läbi mitmeid jagunemisi. Nende jagunemiste käigus tekivad DNAs kahjustused, mis aja jooksul akumulēruvad. (2) Teiseks põhjuseks võib olla testises paiknevate abistajarakkude (nagu Sertoli ja müoloid rakkud) arvukuse langus ning muutused geeniekspressioonis. Lisaks viljakuse vähenemisele on vanemate meeste spermides tõusnud mitmete geneetiliste häirete, kromosoomaalsete aneuploidjate ja mutatsioonide esinemiste osakaal, mis võivad avaldada negatiivset mõju järeltulevale põlvkonnale. Uuringutes on leitud tõendeid hilisemas eas isaks saanud lastel kõrgema skisofreenia, bipolaarse häirete ja autismi esinemissageduste kohta. Üha enam on leitud tõendeid vananemise kaasmõjust oksüdatiivse stressi tõusule.

G-valgud on olulised rakusisesed signaliseerimismolekulid, mis vahendavad paljude rakupinna retseptorite signaale võimaldades rakul adekvaatselt reageerida väliskeskkonna muutustele. G-valkudele on omistatud mitmeid olulisi funktsioone nii organismi arengus kui homöostaasis. Kuna G-valkude normaalne funktsioneerimine on organismi toimimiseks elulise tähtsusega, on see ka väga täpselt koordineeritud mitmete regulaatorvalkude poolt. Üks nendest regulaatorvalkudest on RIC8, mille rolli on näidatud nii G-valkude küllaldaseks olemasoluks rakus kui nende aktivatsiooniks. Kuna G-valgud ja RIC8 on väga laialdase spektriga, ning kõrgelt ekspresseeritud nii testistes kui spermis, oli käesoleva magistritöö eesmärgiks tekitada isassugurakkude spetsiifiline *Ric8* konditsionaalne hiireliin (*Stra8Cre;Ric8<sup>lox/lacZ</sup>*) ning mudeli abil välja selgitada RIC8 roll hiirte viljakuses ja kindlaks teha, kas RIC8 puudus põhjustab häireid spermatogeneesis. Magistritöö teoreetilises osas antakse kirjandusele tuginedes ülevaade G-valkudest; imetajate testiste arengust; postnataalsest spermatogeneesist ja Sertoli ning Leydigi rakkude rollidest nendes protsessides. Magistritöö eksperimentaalse osa eesmärgiks oli tekitada

isassugurakkude (spermatogoonide) spetsiifiline *Ric8* konditsionaalne hiireliin (*Stra8Cre;Ric8<sup>lox/lacZ</sup>*). Loodud hiireliini viljakuse ja fenotüübi iseloomustamise kaudu üritati välja selgitada RIC8 roll hiire (imetajate) spermatogeneesis.



# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1. Imetajate testised ja nende areng

### 1.1.1. Testiste areng

Täiskasvanud imetaja testised ehk munandid on reproduktiivsüsteemi organid, mis täidavad tähtsaid funktsioone nagu spermatogenees ja isas-suguhormoonide tootmine. Testised koosnevad väänilistest seemnetorukeste tuubulitest, mis on ümbritsetud interstitsiaalsete rakkude poolt ning sisaldavad Sertoli rakke, mis on olulised valmivate spermide toitainetega varustamisel (Franca jt., 2005). Testised arenevad XY kromosoomiga isenditel ja nende areng saab alguse paarist mesonefrosegaga seotud gonaadi eellasest. Koduhiire (*Mus musculus*) embrüonaalses arengus vanuses E10.5 – E12.5 toimub Y kromosoomilt *Sry* (*sex-determining region of the Y chromosome*) geeni ekspressioon, mis tagab isas-gonaadide moodustumise ja testiste arengu (Hacker jt., 1995; Bullejos ja Koopman, 2001; Franca jt., 2005). Selles vanuses leiab aset mitte-diferentseerunud gonaadi rakkude diferentseerumine (Merchant-Larios ja Moreno-Mendoza, 2001). Sünnijärgselt toimub gonotsüütide migratsioon vääniliste seemnetorukeste basaalmembraani poole ning kolmandaks elupäevaks ilmnevad hiirtel esimesed funktsionaalsed spermatogoonid tüvirakud (McLean jt., 2003).

### 1.1.2. Sertoli rakud testiste arengus

Sertoli rakud on kesksel kohal testiste arengus kuna toetavad ja suunavad testiste diferentseerumist (Franca jt., 2005). Sertoli rakud pärinevad mesonefroosist ja tsöloomi epiteeliumist (Karl ja Capel, 1998). Spermide tootmise arv sõltub lõplikult Sertoli rakkude arvust (Karl and Capel, 1998). Lisaks moodustavad Sertoli rakud sugurakke auto-immuunvastuse eest kaitsva vere-testiste barjääri ning aitavad luua spermatogeneesi edasisteks etappideks sobilikud tingimused (Nel-Thema jt., 2010; Fan jt., 2012).

Imetajatel on Sertoli rakkude areng sarnane, erinevused liikide vahel ilmnevad enamasti arengu kestvuses ning proliferatsiooni mustris. Sertoli rakkude valmimisel muutub nende tuum suuremaks, tõuseb tuumakese roll ning küpsel Sertoli rakul kaob proliferatsioonivõime (Kumar, jt., 2014). Hiire testiste arengus lõppeb Sertoli rakkude proliferatsioon umbes P16 elupäeval ning jagunemise lõppemine ühtib sugurakkude meioosi algusega puberteedieas. Hiire eluea jooksul Sertoli rakkude arv testistes ei muutu (França jt. 2005; Holsberger ja Cooke, 2005; Sharpe jt., 2003).

Inimestel ja teistel primaatidel toimub Sertoli rakkude proliferatsioon neonataalselt ning suureneb veelgi puberteedi-eas. Täiskasvanud mehel on umbes 4 miljardit Sertoli rakku, vastsündinul on neist olemas 10% (Winters jt., 2006). Sünnijärgse Sertoli rakkude jagunemise eest vastutavad mitmed faktorid, millest suurim osakaal on folliikuleid stimuleerival hormoonil (FSH – *follicle-stimulating hormone*) (Sharpe jt., 2000, Simorangkir jt., 2003; Walker jt., 2005).

Sertoli rakkude geenide ekspressioon on seotud raku küpsusastmega: anti-Mülleri hormooni, aromataasi ja neuronite adhesiooni molekul eksprimeeritakse alles küpsevates Sertoli rakkudes. Ensüüm aromataas on võimeline muutma testosterooni östrogeeniks ja selle kaudu mõjutama nais-suguhormoonide taset organismis. Valminud Sertoli rakkudes eksprimeeritakse androgeeni retseptorit (AR – *androgen receptor*) (Kumar jt 2014; Celec jt., 2015). Lisaks hakatakse Y kromosoomi olemasolul E11.5 – E12.5 vanustel hiirtel Sertoli rakkude poolt tootma TGF  $\beta$  (TGF  $\beta$  – *transforming growth factor*  $\beta$ ) perekonda kuuluvat AMH-i (AMH – *anti-Müllerian hormone*), mis kutsub isas-organismis esile Mülleri juha taandarengu, mis takistab nais-suguteede arengut (Munsterberg ja Lovell-badger., 1991).

### 1.1.3. Leydig'i rakud testiste arengus

Leydig'i rakud vastutavad testosterooni tootmise eest. Testiste arengu käigus tekib kaks erinevat populatsiooni Leydig'i rakke – lootelised (FLC – *fetal Leydig cells*) ja täiskasvanule iseloomulikud. Lootelised Leydig'i rakud tekivad hiirtel E12.5 arengupäeval ning oluliselt pärast sündi, kui need hakkavad dediferentseeruma ja läbivad apoptoosi (Yao jt., 2002). Teine Leydig'i rakkude populatsioon hiire arengus saab alguse pärast sündimist: 5. ja 15. elupäeva vahel

(Vergouwen jt., 1991; Nef ja Parada 2000; Migrenne jt., 2012). FLC-de ülesanne on androgeenide sekreteerimine, millega tagatakse Wolffi-juha säilumine ja isas-organismi suguelundite maskuliinne areng. Hiire arengus saab mees-suguhormoonide tootmine alguse E13 arengupäeval ja selle tase on kõrgeim vahetult enne sündi. Täiskasvanud isaslooma organismis toodavad Leydig'i rakud enim testosterooni (Geissler jt., 1994). Toodetavate androgeenide hulka kuuluvad veel dihidrotestosteroon, androsteendioon, androsteroon, dehüdroepiandrosteroon ja etiokoolanoloon. Loote testistes toodetakse lisaks androgeenidele AMH-i ja insuliini-laadset kasvufaktor 3 (Insl3 - *insulin-like growth factor 3*). Insl3 täidab olulist rolli testiste laskumisel kõhuõõnest munandikotti (Hutson 2009, Nef ja Parada 2000, Klonisch jt. 2004).

On näidatud, et erinevalt looteliste Leydigi rakkudele on täiskasvanu rakkude toimimiseks vajalik LH olemasolu (O'Shaughnessy jt., 1998). Testises asuvate Leydigi rakkude pinnal on LH-d siduvad retseptorid – see stimuleerib testosterooni tootmist (Walker jt., 2005). Arvatakse, et Leydigi rakkude erinevad populatsioonid pärinevad ühisest eellasest.

Enne puberteeti on täiskasvanu Leydig'i rakkude ja peritubulaarsete rakkude areng sõltuv Sertoli rakkudest (Rebourcet jt., 2014). Küpsetes testistes on need asendamatud Leydig'i rakkude arvu säilitamisel, sest Sertoli rakkude eemaldamisel testistest kaovad ka täiskasvanu Leydig'i rakud. Sellest võib järeldada, et Sertoli rakud toodavad Leydig'i rakkude püsimiseks üliolulist faktorit, kuid siiski pole teada, kas see mõjutab Leydig'i rakke otse või nende regulatsioonil osalevate peritubulaarsete müoidrakkude kaudu. (Welsh jt., 2012; Rebourcet jt., 2014).

#### **1.1.4. Müoidrakud**

Peritubulaarsed müoidrakud on elongeerunud ja lameda kujuga rakud ning nende funktsionaalse osa moodustavad müosiin, desmiin/vimentiin ja aktiini filamentid (Davidoff jt., 1990; Romano jt., 2005). Müoidrakud paigutuvad mitmekihiliselt ning panustavad koos Sertoli rakkudega väänilisi seemnetorukesi ümbritseva basaalmembraani moodustamisse (Skinner jt., 1985). Basaalmembraan omakorda toetab Sertoli rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist ning soodustab peritubulaarsete rakkude arenemist (Loveland jt., 1998). Lisaks panustavad peritubulaarsed müoidrakud testiste homöostaasi regulatsioonil ja mitteliikuvate spermide suunamisel munandivõrgu poole (Díez-Torre jt., 2011). Arvatakse, et Sertoli rakkude funktsiooni

ja diferentseerumist ning peritubulaarsete rakkudega interakteerumist vahendab androgeenidest sõltuv ning peritubulaarsete rakkude poolt toodetud molekul – PmodS (*peritubular factor that modulates Sertoli cell function*) (Skinner jt 1985.).

### **1.1.5. Vere – testiste barjäär**

Sertoli rakud on hargnenud kujuga ja moodustavad omavahel ühendusi tiheliiduste kaudu, mis tekitavad füüsilise tõkke vere ja spermatogeense epiteeli vahele ehk vere-testiste barjääri (BTB – *blood testis barrier*). See kaitseb arenevaid sugurakke autoimmuunsete reaktsioonide eest, loob rakkude küpsemiseks sobiliku keskkonna (Griswold ja McLean, 2006). Hiirtel toimub BTB moodustumine teisel elunädalal, P10-P16 elupäeval (Griswold ja McLean 2006). Häired BTB-s võivad kaasa tuua immuunvastuse apikaalses osas olevatele meiootilistele ja postmeiootilistele rakkudele, mille tulemusel häirub spermatogenees, küpsete spermide teke ja kaasneb mehepoolne viljatus (Skinner jt., 1985).

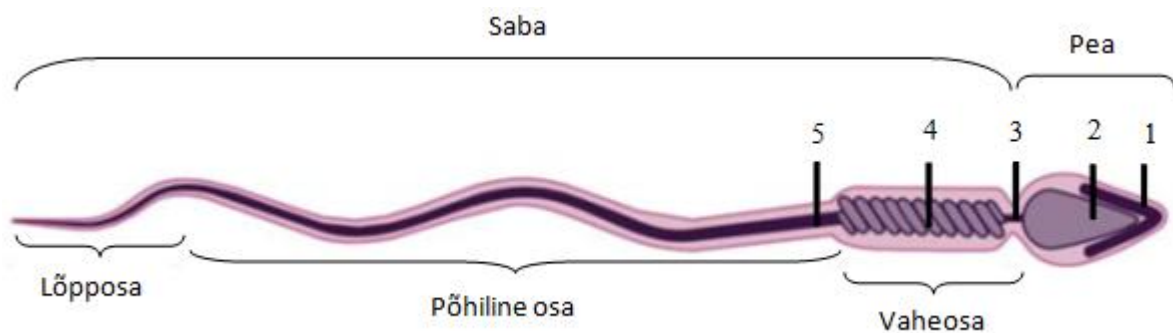
## **1.2. Spermi ehitus**

Spermatogeneesi läbinud spermid on lõplikult diferentseerunud rakud, mille funktsiooniks on munaraku viljastamine ja isapoolse genoomi toimetamine munarakku. Sperm koosneb peast, kaelast ja sabaosast (joonis 1). Pea tipmises osas asub akrosoom, mis sisaldab ensüüme: hüaluronidaas, arüülsulfataas, happelist ja aluselist fosfataasi, glükosidaasi ja akrosiini (Borg jt 2010). Sabaosa võib jaotada kolmeks: keskosa (*midpiece*), vaheosa (*principal piece*) ja lõpuosa (*end piece*). Vaheosas paiknevad mitokondrid, mille põhiülesandeks on saba energiaga varustamine (Diez- Sánchez jt., 2003). Kaela osas paikneb tsentriool, mis pärast viljastumist duplitseerub ja moodustab koos munaraku tsütoplastmast saadava materjaliga sügoodi tsentrosoomi, millest saab alguse sügoodi esimene mitoosikälv (Chemes jt., 2012).

Imetajate spermid saavad liikumiseks ja oma funktsioonide täitmiseks vajamineva energia monosahhariididest - glükoosist, fruktoosist ja sorbitoolist, mis toodetakse erinevates kudedes

mehe reproduktiivtraktis (Kobayashi jt., 2002). Lisaks võivad spermidele energia-allikateks olla ka laktaat, püruvaat, tsitraat ja glütserool. Mitteheksooside (*nonhexose*) kasutamine on vajalik spermide ellujäämiseks ja viljastamiseks monosahhariidide vaeses keskkonnas (Medrano jt., 2006; Cao jt., 2009; O'Shea ja Wales, 1965).

Spermides puudub ribosomaalne RNA (*rRNA* – *ribosomal RNA*), aga erinevate imetajate spermides tuvastatud mRNA (*messenger RNA*) ja pikkade mittekodeerivate RNA-de (lnc – *long non-coding RNA*) ning mikroRNA-d olemasolu (Ostermeier jt., 2002; Krawetz, 2005; Das jt., 2013).



**Joonis 1. Spermi ehitus.** Sperm koosneb pea ja sabaosast, neid seob omavahel kaelaosa 1. Akrosoom 2. Tuum 3. Kael 4. Mitokondrid 5. Plasma-membraan. (Muudetud Borg jt., 2010)

### 1.3. Spermatogeneees

#### 1.3.1. Spermide pre- ja postnataalne areng

Imetaja testistes on väänilised seemnetorukesed ümbritsetud Leydig'i rakkudest, veresoontest, leukotsüütidest ja fibroblastidest koosneva koega. Väänilistes seemnetorukestes toimub spermatogeneees, mis on organiseeritud ja kompleksne protsess ning mille käigus toimub kolm erinevat etappi – mitoos, meioos ja spermiogenees (joonis 2). (Stukenborg jt., 2014; Nel-

Themaat jt., 2010). Mitoosi käigus toimub diploidsete spermatogoonide arvukuse kasv meioosis leiab aset spermatotsüütide DNA rekombinatsioon ja haploidsete rakkude teke. Spermogenees on spermatiidide diferentseerumine viburiga spermideks.

Postnataalselt on organismis ainult spermatogoonid, mis läbivad enne spermatotsüüdiks diferentseerumist 8 – 9 jagunemist. Basaalembraani läheduses paiknevaid spermatogoone jaotatakse kaheks: tüüp A on diferentseerumata sugurakud, mille heterokromatiini sisaldus tuumas on madal. Paiknemise põhjal jaotatakse neid kolmeks: üksikult – As (*A-single*), paardununa – Apr (*A-paired*) ja joondununa – Aal (*A-aligned*). Jagunemise ja küpsemise tulemusel muutuvad nad B tüüpi – diferentseerunud – spermatogoonideks. Neis on heterokromatiini oluliselt rohkem.

Spermogenees jätkub puberteedi-eas, kus küpsevad spermatotsüüdid läbivad meioosi ja tekivad spermatiidid. Arenevad spermatotsüüdid ja spermatiidid on omavahel ühenduses intratsellulaarsete sildadega. Ainukesed ilma intratsellulaarsete sildateta rakud on spermogeneesil tüvirakkudeks olevad A-tüüpi üksikud spermatogoonid (De Rooij ja Russell, 2000; Fan jt., 2012).

### **1.3.2 Spermiatsioon, spermogenees ja kapatsitatsioon**

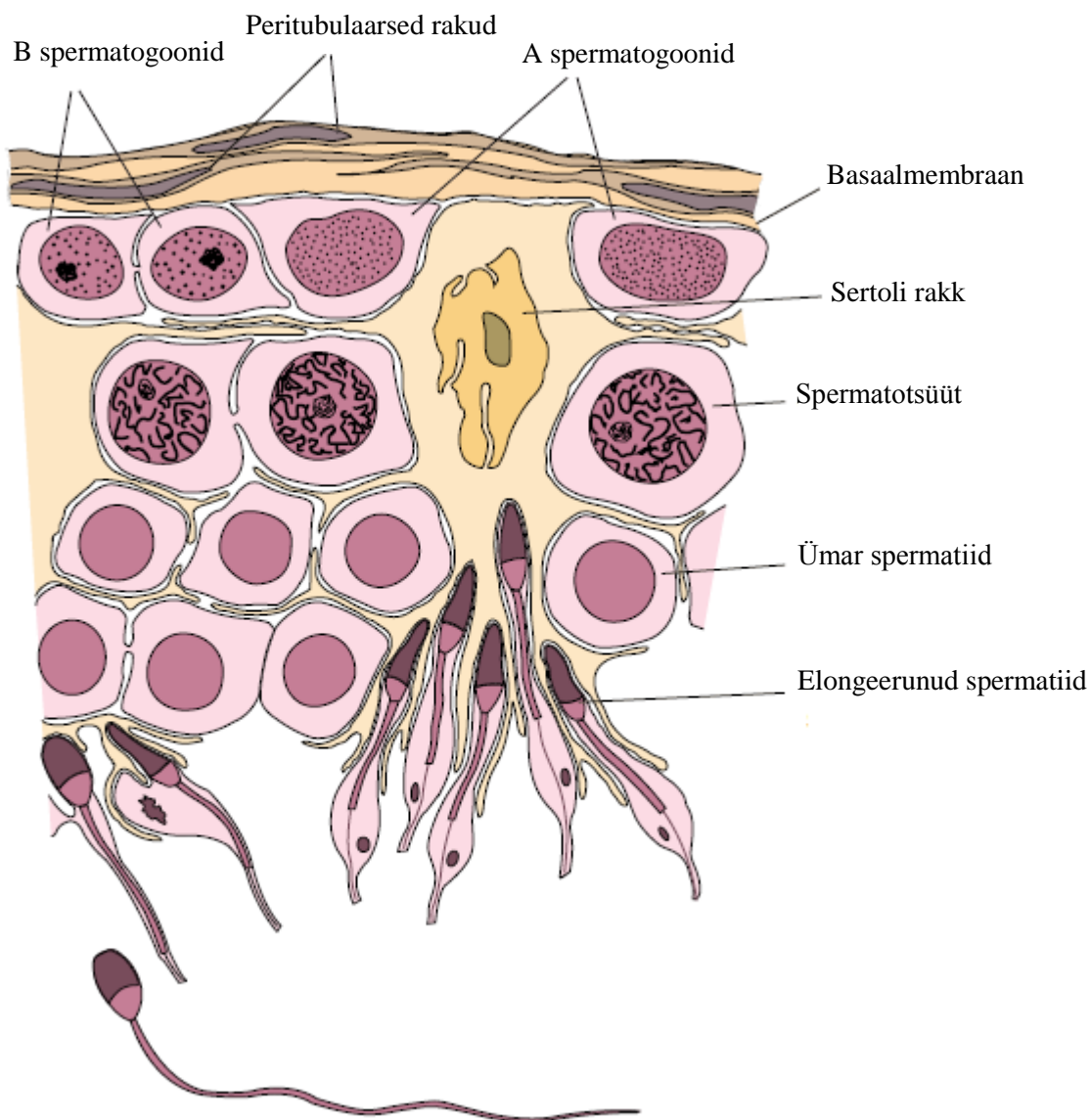
Spermiatsiooniks nimetatakse pikaajalist protsessi (näiteks rotil kuni 82 h), kus küpsed spermatiidid vabanevad Sertoli rakkudest ning sisenevad vääniliste seemnetorukeste valendikku, kust nad edasi liiguvad munandimanusesse. Vabanemise ajal eemaldavad Sertoli rakud fagotsüteerimise teel spermatiidide peaosast tsütoplasma tilgakese (Russell jt., 1993), milles paiknevad erinevad valgud, Golgi kompleks ja ER (O'Donnell jt., 2011). Häired spermiatsioonil võivad mõjutada Sertoli rakkude signaaliseerimist ja funktsiooni ning seeläbi ka varasemas etapis olevate rakkude arengut (Rainey jt., 2010).

Spermogeneesi alguseni vahendavad Sertoli rakkude ja eloneeruvate spermatiidide vahelist interaktsiooni ektoplasmaatilised spetsialiseerituspiirkonnad (ES – *ectoplasmic specialization*).

Samad piirkonnad vastutavad ka Sertoli rakkude rakusisesel adhesiooni eest vere-testiste barjääri moodustamisel (Vogl jt., 2000).

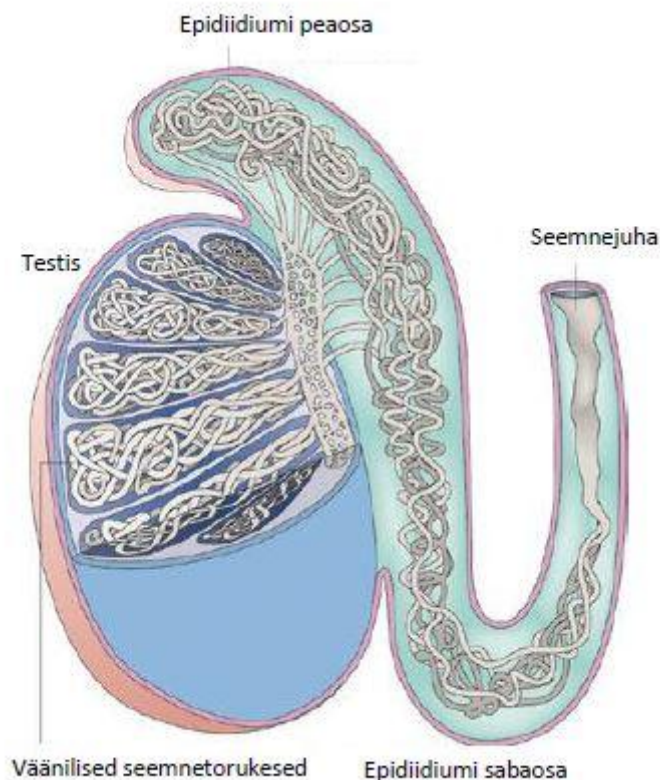
Pärast spermiatsiooni väljuvad spermid testistest, kuid pole veel täielikult välja arenenud. Liikuvateks ja viljastamisvõimeliseks saavad spermid epididiumis ehk munandimanuses, kus toimub spermide transport, kontsentreerumine ja säilitamine. Munandimanus on jaotunud erinevate ultrastruktuuridega ja funktsioonidega kolmeks osaks (joonis 3). Pea- (*caput*) ja keskosa (*corpus*) on olulised varajastel ja hilistel spermide küpsemisel. Sabaosas (*cauda*) toimub küpsete spermide varundamine. Munandimanuses liikumise ja küpsemise käigus toimub mitmeid muutusi ka spermi plasmamembraani valkude koosseisus. (Suryawanshi jt., 2012)

Spermi lõplik küpsemine leiab aset aga nais-suguteedes kapatsitatsiooni käigus, mille tulemusel saavutatakse spermi võime viljastada munarakk. Kapatsitatsiooni käigus väheneb spermi plasmamembraanis kolesterooli osakaal ja membraan muutub voolavamaks. Lisaks tõuseb rakusisesel  $Ca^{2+}$  ja cAMP (tsükliline adenosiinmonofosfaat) kontsentratsiooni tase ning türosiini fosforüleerimine, mis hüperaktiveerib spermi ja tema liikumisvõime (Visconti jt., 1995; Ferramosca jt., 2014). Kapatsiteerunud rakud on võimelised läbima akrosomaalreaktsiooni (AR - *acrosome reaction*), mille käigus spermi plasmamembraan ja akrosoomi membraan liituvad ning vabastatakse ensüümid, mis võimaldavad spermil tungida läbi munaraku välise kesta (Menkveld jt., 2003).



**Joonis 2. Spermatogenees – küpsete spermide moodustumine.** A-tüüpi spermatogoonid on diferentseerumata sugurakud, mis on võimelised jagunemisel end taastootma, jagunedes kas kaheks As (*A-single*) rakuks või diferentseerumata B tüüpi spermatogoonideks. Diferentseerumisel jäävad tütararakud omavahel ühendatuks tsütoplasmaatiliste sildadega. Spermatogoonide jagunemisi võib olla kokku 9-10 ja nende tulemusel tekivad lõpuks spermatotsüüdid. Meiootilise jagunemise tulemusena moodustuvad neist spermatiidid, millest tekivad viburiga spermid. Nende vabanemine toimub vääniliste seemnetorukeste valendikku. Küpsevaid rakke ümbritsevad Sertoli rakud. (Muudetud De Rooij jt., 2008)





**Joonis 3.** Testiseid ja seemnejuha ühendav epidididium koosneb pea-, kesk- ja sabaosast, kus toimub spermide lõplik küpsemine ja varundamine. (Muudetud:Arnheim ja Calabrese, 2009)

### 1.3.3. Hapniku reaktiivsed osakesed spermatogeneesis

Hapniku reaktiivseteks osakesteks (ROS – *reactive oxygen species*) võivad olla paardumata elektronidega molekulid – vabad radikaalid või teiste ainetega reageerides vabu radikaale tootvad molekulid (Garratt ja Brooks 2012). ROS-id tekivad mitokondrites rakulise metabolismi käigus, kui vajaliku energia tootmiseks toimub hapniku taandamine (Valko jt., 2007). ROS-id vajalikud spermide kapatsitatsioonis, eelkõige türosiini fosforüleerimisel (de Lamirande jt., 1997; Armstrong jt., 1999). Lisaks aitavad ROS-id kaasa spermidega toimuvatel protsessidel nagu hüperaktivatsioonil, akrosomaalreaktsioonil, spermi ja ootsüüdi fusioonil (de Lamirande jt., 1997). Kõrge ROS-ide osakaal võib aga tekitada rakulisi kahjustusi ja põhjustada organismis oksüdatiivset stressi. (Garrido jt., 2004).

Organism on võimeline end kaitsma vabade radikaalide negatiivse mõju eest mitmete meetoditega: näiteks erinevate ensümaatiliste antioksidantide tootmise ja spermides DNA pakkimisega protamiinidesse (Olivia jt., 2006). ROS'id võivad siiski põhjustada spermide DNA kahjustamist ning seeläbi viljatust (Aitken jt., 2010). Teiseks võivad ROS-id vigastada spermide membraani, mis omakorda pärsib ATP tootmist ja vähendab spermide liikumisvõimet (Amstrong jt., 1999; Tremellen; 2008). Lisaks on näidatud, et vabade radikaalide kõrgem osakaal isasloomades avaldab osalist mõju järgnevatele põlvkondadele. ROS-idega töödeldud hiire spermidega viljastatud järglased olid sünnihetkel väiksema kaaluga, kuid vanuseks P7 olid kõik uuritavad hiired sarnase kaaluga. ROS-ide mõju leiti ka isasloomade keharasva tasemele, mis tõusis ajutiselt neljanda ja kaheksanda elunädala vahel (Lane jt., 2014).

#### 1.4. G-valgud

Signaalide ülekandes rakuvälisest keskkonnast rakku vastutavad G-valgud, mis esinevad kõikides eukarüootsetes rakkudes ning on olulised erinevates arengulistes etappides, metabolismi kontrollis, humoraalsel- ja neuraalsel regulatsioonis (Simon et jt., 1991). G-valgud jaotatakse väikesteks ja heterotrimeerseteks G-alkudeks. Väiksemad G-valgud on umbes 200 nukleotiidiist koosnevad polüpeptiidid, mille funktsioonide hulka kuuluvad rakkude kasv, alkude sekretsioon ja rakusiseste vesiikulite interaktsioon (Simon jt., 1991). Heterotrimeersed G-valgud on seotud rakupinnal paiknevate retseptoritega ning neil on kolm alaühikut –  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ . G-alkude põhilised omadused sõltuvad enim  $\alpha$ -alaühikust, mis jaotatakse ekspressioonimustrite järgi nelja perekonna vahel:  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_i}/G_{\alpha_o}$ ,  $G_{\alpha_q}/G_{\alpha_{11}}$  ja  $G_{\alpha_{12}}/G_{\alpha_{13}}$  (Wettschureck ja Offermannus, 2005). Imetajates on kirjeldatud 20 erinevat G-alku, mis kõik omavad iseloomulikku 33–55 kDa suurust  $\alpha$ -alaühikut, mis on kompleksis väiksemate  $\beta$ - ja  $\gamma$ -alaühikutega (~35 kDa; ~15 kDa) (Malbon, 2005). Erinevaid  $\beta$ -alaühikuid on kokku 5 ja  $\gamma$ -alaühikuid 12. G-alkude mitmekülgsus signaali edastamises on tagatud erinevate alaühikute kombinatsioonidega (Malbon, 2005).

Signaali edastust väliskeskkonnast vahendab membraanseoseline G-alkuga seotud retseptor (GPCR - *G-protein coupled receptors*), mis reageerib erinevatele hormoonidele, neurotransmitteritele ja ioonidele (Rosenbaum jt., 2009). Membraanil asuvatele retseptoritele on

iseloomulik  $\alpha$ -heeliksitest koosnev seitse korda membraani läbiv struktuur, kus N-terminaalne ots on rakuvälises osas ning C-terminaalne ots rakusiseses keskkonnas. Rakuvälise ligandi seondumine kutsub esile retseptori konformatsioonilised muutused, mille tulemusel G-valgud aktiveeruvad. Inaktiivne  $G\alpha$ -subühik, mis on seondunud guanosiin difosfaadiga (GDP - Guanosine di-phosphate) muutub aktiivseks kui GDP vahetatakse guanosiin trifosfaadi (GTP - Guanosine tri-phosphate) vastu. Selle tagajärel vabaneb  $G\alpha$ -subühik  $\beta\gamma$ -kompleksist ning käivitatakse rakusiseste signaalide ahel, mis avaldavad mõju adenüülütsüklaasile, fosfolipaasidele ja ioonkanalitele (Simon jt., 1991; Merlet jt., 1999; Oldham jt., 2007).

G-valkude olemasolu on näidatud erinevate imetajate (inimene, hiir, pull) spermide plasmamembraanis (Merlet jt., 1999). Hiire spermides on tuvastatud erineva tasemega  $G\alpha_i$  isovorme, kus madalaima ekspressiooniga on  $G\alpha_{i1}$  (Baxendale jt., 2003).  $G\alpha_{i2}$  ekspresseerub kõrge tasemega spermide sabaosas ja akrosoomis ning  $G\alpha_{i3}$  katkendlikult pea konvekses osas, ekvaatoris ja sabaosas (Baxendale jt., 2003). Arvatakse, et  $G\alpha_{i1}$ ,  $G\alpha_{i2}$  ja  $G\alpha_{i3}$  võivad mõjutada spermi viburi liikuvust (Baxendale jt., 2003). Akrosoomis paiknevaid  $G\alpha_{i2}$  ja  $G\alpha_{q/11}$  on seostatud akrosomaalreaktsiooni esilekutsumisega. Näiteks inimese spermides on kõrge ekspressiooniga näidatud  $G\alpha_{q/11}$  valku membraani ja ekvatoriaal-alas, mis on esmaseks sugurakkude seondumiskohaks (Merlet jt., 1999), mis annab alust arvata selle olulisusest spermi ja munaraku ühinemisel ja viljastamise edasistel etappidel (Merlet jt., 1999).

Ka ROS-ide mõju on näidatud G-valkude regulatsioonil. ROS-ide hulka kuuluv  $H_2O_2$  ei mõjuta  $G\beta\gamma$ , kuid põhjustab muutusi  $G\alpha_o$  aktivatsioonil, mis toob kaasa  $G\beta\gamma$  dissotsieerumise. Lisaks võib ROS-ide kõrge tase kiirendada  $G\alpha_o$ -lt GDP vabanemist (Nishida jt., 2000).

### 1.5. RIC 8 – guaniini nukleotidivahetusfaktor

Nukleotidivahetusfaktor RIC8 (*Resistance to inhibitors of cholinesterase 8*) on G-valgu  $\alpha$ -subühiku signaali võimendav valk, mis seostub inaktiivse GDP- $G\alpha$  kompleksiga ning soodustab GDP vabanemist ning stabiilse nukleotidivaba  $G\alpha$ -RIC8 moodustumist. Stabiilne  $G\alpha$ -RIC8 toimib retseptorist sõltumatu signaali võimendajana lubades GTP-l taas seonduda  $G\alpha$  subühikuga (Tall jt., 2003).

RIC8 valku kirjeldati esmalt varbussis *Caenorhabditis elegans* 1996. aastal, kui otsiti närviülekanne mõjutavate geenide mutatsioone (Miller jt., 1996). RIC8 funktsiooni on näidatud nii varbussi kui ka puuviljakärbse (*Drosophila melanogaster*) rakkude asümmeetrilisel jagunemisel varajasel embrüonaalsel arenguetapil ja neuroblastide arengul. Olulist rolli rakkudevahelises sünaptilises ülekandes ja embrüogeneesis omades on RIC8 saanud ka nime – Synembryn (Miller ja Rand, 2000; Miller jt., 2000; Afshar jt., 2005; Wang jt., 2005). Erinevalt *C. elegans*'i ja *Drosophila*' *Ric8* geenile on imetajates kaks *Ric8* paraloogi – *Ric8a* ja *Ric8b* (Tall jt., 2003). Need on võimelised seonduma G-valgu nelja erineva  $\alpha$ -subühikuga. RIC8A toimib retseptorist sõltumatu nukleotiidivahetusfaktorina  $G_{\alpha_i}$ ,  $G_{\alpha_q}$  ja  $G_{\alpha_{12/13}}$  subühikutele. RIC8B toimib nukleotiidivahetusfaktorina  $G_{\alpha_s}$ ,  $G_{\alpha_q}$ ,  $G_{\alpha_{olf}}$  and  $G_{\alpha_{13}}$  subühikutele (Miller jt., 1996, Chan jt., 2011, Ruisu jt., 2013). Lisaks on näidatud RIC8 rolli G-valgu  $\alpha$ -subühiku biosünteesi soodustavate molekulaarsete *chaperoniden*  $G\alpha$  alaühiku kokkupakkimisel ja rakumembraaniga seondumisel (Tall jt., 2013, Chan jt., 2013).

Imetajates on *Ric8* ekspressioonii näidatud hiire varajases närvisüsteemi arengus ning samuti täiskasvanu ajus õppimist ja taju mõjutavates ajuosades (Tõnissoo jt., 2003). Käitumiskatsetega on näidatud, et haplodefitsiitsetel *Ric8*<sup>+/−</sup> hiirtel esinevad ärevushäired, vähenenud õppimisvõime ja ruumiline taju (Tõnissoo jt., 2006). Homosügootsed *Ric8*<sup>−/−</sup> mutandid surevad embrüonaalses arengujärgus, nad on võimelised alustama gastrulatsiooni, kuid surevad varajases embrüonaalses vanuses (E6.5-8.5) ulatuslike defektide tõttu (Tõnissoo jt., 2010). Postmitootiliste diferentseerunud neuronite spetsiifilise konditsionaalse *Ric8 knock-out* hiirtel esinevad neuromuskulaarsed häired ning nad surevad postnataalselt paari päeva vanuselt (Ruisu jt., 2013). RIC8 puudumine neuraalsetest eellasrakkudest kutsub aga esile häired neokorteksi arengus seoses muutustega ajukoore basaalmembraani terviklikkuses ning eellasrakkude jagunemises (Kask jt., 2015).

Lisaks närvisüsteemi uurimisele on viimastel aastatel hakatud tähelepanu pöörama ka sugurakkude arengule. Varasematest töödest on leitud, et hiire spermatogeneesis on *Ric8* ekspresseerunud arenevates seemnerakkudes ja Leydig'i rakkudes (Pert, 2012). RIC8 lokaliseerub arenevas munandis vanuses E13.5 gonotsüütide rakuplasmas hajusalt, E17.5 vesiikulilaadsete struktuuridena ning P9 spermatotsüütide rakuplasmas (Pert, 2012). Täiskasvanud hiires lokaliseerub RIC8 spermatogoonide, spermatotsüütide ja spermatiidide

rakuplasmas vesiikuli- ja kanalilaadsete struktuuridena (Pert, 2012). Munandimanusest pärit spermides on RIC8 lokaliseerunud akrosoomis ning sabapiirkonnas ning selle lokalisatsioon ei muutu kapatsitatsiooni ja akrosomaalreaktsioon järgselt (Pert, 2012).

## **1.6. *Stra8* –Cre hiireliin**

Antud töös kasutatud *Stra8*-Cre hiireliin on saadaolevatest spermatogeneesi-spetsiifilistest liinides arenguliselt kõige varajasema ekspressiooniga. Ekspressioon saab alguse kolmandal sünnijärgsel päeval ning spermatogoonides ja pre-leptoteensetes spermatotsüütides. Rekombinatsiooni tase on vähemalt 95% (Lomeli jt., 2000; Sadate-Ngatchou jt., 2008).

*Stra8* (*Stimulated by retinoic acid 8*) geen kodeerib tsütoplasmaatilist valku ning on olulisel kohal sugurakkudes meioosi indutseerimisel. See geen on konserveerunud inimese, šimpansi, reesus-ahvi, koera, lehma, roti, kana ja konna genoomis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/346673>). Isastes hiirtes ekspresseerub sünni-järgsel perioodil mitootiliselt aktiivsetes premeiootilistes spermatogoonides ning nendest arenevates rakkudes (Oulad-Abdelghani jt. 1996; Anderson jt., 2008; Bao jt., 2013). Ekspressioon täiskasvanud hiirel piirdub premeiootilistes idurakkudes (Miyamoto jt., 2002).

## 2. EKSPERIMENTAALNE OSA

### 2.1. Töö eesmärgid

Käesoleva magistritöö suuremaks eesmärgiks oli tekitada isassugurakkude spetsiifiline *Ric8* konditsionaalne hiireliin (*Stra8Cre;Ric8<sup>lox/lacZ</sup>*) ning seda mudelina kasutades püstitati järgmised kitsamad eesmärgid:

1. Välja selgitada RIC8 roll hiirte viljakuses
2. Välja selgitada kas RIC8 puudus põhjustab hiirtel häireid spermatogeneesis

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Töös kasutatud hiireliinid

Spermide eellasrakkude (spermatogoonide) spetsiifilise (*Stra8Cre;Ric8<sup>lox/lacZ</sup>*) konditsionaalse hiireliini tekitamiseks kasutati järgmisi hiireliine:

1. *Stra8Cre<sup>+/-</sup>* (transgeenne hiireliin, kus spermatogoonide-spetsiifiline Cre-rekombinaasi ekspressioon on kontrollitud hiire *Stra8* promootori poolt (FVB-Tg(*Stra8-icre*)1Reb/LguJ; Jackson Laboratory).
2. *Ric8<sup>lox/lox</sup>* (transgeenne hiireliin, mis sisaldab märklaudgeenis *Ric8* LoxP järjestusi (Ruisu jt., 2013).
3. *Ric8<sup>lacZ/+</sup>* (*lacZ knock-in* hiireliin, kus *Ric8* lookusesse on viidud reportergeen *lacZ*, sellelt sünteesitava  $\beta$ -galaktosidaasi ekspressioon jälgendab *Ric8* ekspressiooni) (Tõnisoo jt., 2006). *Stra8Cre* transgeeni ekspressiooni kontrollimiseks kasutati Cre-reporterliini B6.129S4-*Gt(Rosa)26Sortm1Sor/J* (edaspidi nimetatud kui *Rosa26<sup>LacZ/LacZ</sup>*).

Kontrollina kasutati metsiktüüpi (edaspidi nimetatud kui *wt* (*wild type*)) C57Bl/6J hiireliini. Kõik töös kasutatud hiireliinid viidi ühtlasele geneetilisele taustale kasutades C57Bl/6J hiireliini. Magistritöös kasutatud katseloomad kasvasid standardsetes laboritingimustes ning neile oli

võimaldatud ööpäevaringselt vabalt kättesaadav puhas vesi ja toit. Katseloomad hukati vastavalt Euroopa Liidus kehtestatud nõuetele selleks luba (FELASA) omava spetsialisti poolt.

Magistritöös kasutatud embrüote puhul loeti embrüonaalseks vanuseks E0.5 päev, mil detekteeriti emashiirel kopulatsiooniakti-järgne vaginaalne limakork. Postnataalseks vanuseks P0 loeti sündimise päev.

### 2.2.2. Hiirte ristamine

Alljärgnevalt on ära toodud peamised ristamisstrateegiad, kus on arvestatud nõ. ideaalset Mendeli lahknevust.

1. *Stra8Cre* transgeeni kontrolliks kasutati järgnevat ristamisskeemi:

$$\text{♂} \textit{Stra8Cre}^{+/-} \times \text{♀} \textit{Rosa26}^{LacZ/LacZ}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Stra8Cre}^{+/-}; \textit{Rosa26}^{LacZ/+} \text{ (kasutati edasistes X-gal värvusreaktsiooni katsetes)}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Stra8Cre}^{-/-}; \textit{Rosa26}^{LacZ/+} \text{ (kasutati kontrollina)}$$

2. Isassugurakkude spetsiifilise *Ric8* konditsionaalse *Stra8Cre;Ric8<sup>lox/lacZ</sup>* hiireliini (edaspidi nimetatud kui *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>*) tekitamiseks kasutati järgmisi ristamisi:

$$\text{♂} \textit{Stra8Cre}^{+/-} \times \text{♀} \text{C57Bl/6J} \text{ (hiireliini paljundus)}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Stra8Cre}^{+/-} \text{ (nendest isaseid hiiri kasutati edasistes ristamistes)}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Stra8Cre}^{-/-}$$

$$\text{♂} \textit{Ric8}^{LacZ/+} \times \text{♀} \text{C57Bl/6J} \text{ (Ric8}^{LacZ/+} \text{ hiireliini paljundus)}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Ric8}^{LacZ/+} \text{ (emaseid hiiri kasutati edasistes ristamistes)}$$

$$\frac{1}{2} \textit{Ric8}^{+/+}$$

$$\text{♂} \textit{Ric8}^{lox/lox} \times \text{♀} \textit{Ric8}^{lox/lox} \text{ (Ric8}^{lox/lox} \text{ hiireliini paljundus)}$$

$$\textit{Ric8}^{lox/lox} \text{ (emaseid hiiri kasutati edasistes ristamistes)}$$

$$\text{♂} \textit{Stra8Cre}^{+/-} \times \text{♀} \textit{Ric8}^{LacZ/+} \text{ (Stra8Cre;Ric8}^{LacZ/+} \text{ vaheeristandite tekitamiseks)}$$

$$\frac{1}{4} \textit{Stra8Cre}^{+/-}; \textit{Ric8}^{LacZ/+} \text{ (isaseid hiiri kasutati edasistes ristamistes)}$$

$$\frac{1}{4} \textit{Stra8Cre}^{-/-}; \textit{Ric8}^{LacZ/+}$$

$$\frac{1}{4} \textit{Stra8Cre}^{+/-}; \textit{Ric8}^{+/+}$$

$$\frac{1}{4} \textit{Stra8Cre}^{-/-}; \textit{Ric8}^{+/+}$$

♂ *Stra8Cre*<sup>+/-</sup>; *Ric8*<sup>LacZ/+</sup> x ♀ *Ric8*<sup>lox/lox</sup> (*Stra8Cre*; *Ric8*<sup>-/-</sup> tekitamiseks)

1/4 *Stra8Cre*<sup>+/-</sup>; *Ric8*<sup>LacZ/lox</sup> (*Stra8Cre*; *Ric8*<sup>-/-</sup>)

1/4 *Stra8Cre*<sup>-/-</sup>; *Ric8*<sup>LacZ/lox</sup>

1/4 *Stra8Cre*<sup>+/-</sup>; *Ric8*<sup>+/lox</sup>

1/4 *Stra8Cre*<sup>-/-</sup>; *Ric8*<sup>+/lox</sup>

3. *Stra8Cre*; *Ric8*<sup>-/-</sup> isase hiire viljakuse ja järglaste fenotüübi hindamiseks kasutati järgmist ristamisskeemi

♂ *Stra8Cre*; *Ric8*<sup>-/-</sup> x ♀ C57Bl/6J

1/4 *Stra8Cre*<sup>+/-</sup>; *Ric8*<sup>LacZ/+</sup>

1/4 *Stra8Cre*<sup>-/-</sup>; *Ric8*<sup>LacZ/+</sup>

1/4 *Stra8Cre*<sup>+/-</sup>; *Ric8*<sup>+/lox</sup>

1/4 *Stra8Cre*<sup>-/-</sup>; *Ric8*<sup>+/lox</sup>

### 2.2.3. Hiirte genotüpiseerimine

Embrüote genotüpiseerimiseks kasutati rebukoti koematerjali. Postnataalsete hiirte (P3 ja P7) ning täiskasvanud hiirte genotüpiseerimiseks kasutati saba otsast eraldatud koematerjali. *Stra8Cre*; *Ric8*<sup>-/-</sup> hiirte kontrollimiseks kasutati munandimanusest välja pestud sperme.

Genoomse DNA eraldamiseks kudedest lüüsi neid üleöö 55°C juures 100 µl lüüsilahuses (lüüsipuhver (180 mM Tris-HCl (pH 9.0); 20 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0.02% Tween 20) (Solis), proteinaas K (0.9 U) (Fermentas) ning deioniseeritud vesi (ddH<sub>2</sub>O)). Spermide lüüsimine viidi läbi 50 µl-s eelpool kirjeldatud lüüsilahuses, mille paremaks toimimiseks lisati DTT (ditiotreitol, 0.01 M) (Jiang jt., 2005). Peale koeproovide lüüsimist peatati proteinaas K ensümaatiline aktiivsus kuumutades neid 98°C 15 minutit. Selleks, et vältida koematerjali otsest sattumist PCR-il analüüsitavatesse proovidesse, tsentrifuugiti proove 10 minutit täispöoretel (13000 p/min) (Eppendorf Biofuge Pico) ning teostati genoomse DNA materjaliga alleelspetsiifiline polümeraasi ahelreaktsioon (PCR). Geenialleelide genotüpiseerimiseks kasutati järgmisi praimereid:



*Stra8Cre*<sup>+/-</sup>:

Stra8F: 5' – GTG CAA GCT GAA CAA CAG GA – 3'

iCreR1: 5' – TGT GGA TCA GCA TTC TCC CA – 3'

*Ric8*<sup>lox/+</sup>

riccregenoF: 5' – GGT AGG GCT CAA TGT TGG – 3'

riccregenoR: 5' – GCC AAA CAA TCT CTC GAA CC – 3'

*Ric8*<sup>LacZ/+</sup>

LacZ300: 5' – CGCA TCG TAA CCG TGC ATC T – 3'

RicptggenoF: 5' – CTC TCC CAG CAT CCC TCA C – 3'

Ptgin1rev: 5' – CAC ACC CCA GCC GAG TTG – 3'

*Stra8Cre*<sup>+/-</sup>*Ric8*<sup>lox</sup> (Cre-rekombinaasi aktiivsus):

ric5floxgeno: 5' – CTT TTC CAC GGG TGT TCT TC – 3'

riccregenoR: 5' – GCC AAA CAA TCT CTC GAA CC – 3'

Reaktsioonisegu kogumahuks oli 10 µl ning komponentidena kasutati: 1x (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> puhvrit (Solis), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 0.2 mM dNTP, praimereid 0.25 µM, Taq polümeraas 0.02 U/µl, ddH<sub>2</sub>O. Rebukotist või sabast pärinevat genoomset DNA-d sisaldavat materjali lisati 1 µl. PCR teostati masinal Biometra T4 Proffessional Thermocycler (Biometra).

PCR-i programmi tingimused *Stra8Cre*<sup>+/-</sup> genotüüpiseerimiseks olid järgmised:

94°C 3 min

94°C 30 s

67°C 1 min	}	35 tsüklit
72°C 1 min		
72°C 2 min		

PCR-i programmi tingimused *Ric8*<sup>LacZ/+</sup> ja *Ric8*<sup>lox/+</sup> genotüüpiseerimiseks olid järgmised:

95°C 5 min

95°C 30 s	}	31 tsüklit
58°C 40 s		
72°C 1 min		

72°C 10 min

PCR-i programmi tingimused *Stra8Cre*-rekombinaasse aktiivsuse hindamiseks olid järgmised:

95°C 5 min

95°C 30 s

58°C 40 s

72°C 2 min 30 s

72°C 10 min

} 31 tsüklit

PCR-l amplifitseeritud DNA produktid analüüsiti agaros-geelelektroforeesil *Tris-boraat-EDTA* puhvris (TBE puhver). Agarosgeel oli vastavalt 1% või 1.5%, sõltuvalt produktide pikkusest. DNA pikkusmarkeriks kasutati 100bp või 1kb DNA redelit (Solis BioDyne).

#### **2.2.4. *Stra8Cre* ekspressiooni kontroll $\beta$ -galaktosidaasi värvusreaktsiooniga**

*Stra8Cre* transgeeni ekspressiooni kontrollimiseks kasutati postnataalses vanuses P3 olevaid *Stra8Cre*<sup>+/+</sup>; *Rosa26*<sup>LacZ/+</sup> loomi ja kontrolliks nende pesakonnakaaslasi (ristamisskeem §2.2.2.). Ohverdatud hiirtel dissekteeriti testised jahedas PBS-is, mis fikseeriti 4% PFA/PBS-is 4°C juures 60 min. Pärast fikseerimist pesti testiseid pesupuhvris (100 mM PBS (pH 7.3), 72 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 28 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) 15 min., millele järgnes X-gal (5-bromo-4-klooro-indolüül- $\beta$ -D-galaktopüranosiid) värvusreaktsiooni läbiviimine. Testiseid inkubeeriti X-gal lahuses (1x pesupuhver, 5 mM kaaliumferriitsüaniid, 5 mM kaaliumferrotsüaniid, 1 mg/ml X-gal (20 mg/ml dimetüülformamiidis)) pimedas 4°C juures üleöö ning seejärel pesti 3x15 min PBS-is. Seejärel järelfikseeriti 4% PFA/PBS lahuses 1h ning pesti PBS-ga. Kudesid säilitati pildistamiseni PBS-is 4°C juures.

### 2.2.5. Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR)

Täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=3) ja *wt* (n=3) isaste hiirte testised dissekteeriti ning lüüsiiti Trizol reagentiga (TRIzol® Reagent, Life Technologies) arvestusega 1 ml 100 mg koekaalu kohta. Kudede paremaks lagundamiseks kasutati homogenisaatorit (IKA Turrax T8 Netzteil T8.01). Totaalse RNA eraldamisel ja cDNA sünteesil kasutati tootjaprotokolli (TRIzol Reagent; Life Technologies; 2012). Kvantitatiivne reaalaaja PCR (qRT-PCR) analüüs viidi läbi StepOnePlus Real-Time PCR System masinal (Applied Biosystems) kasutades StepOne Software v2.0 tarkvara. Reaktsioonimahuks oli 10 µl, mis sisaldas 1 µl cDNA proovi, 2 µl HOT FirePol® EvaGreen qPCR Mix Plus segu (1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, EvaGreen® värv, HOT FIREPol® DNA Polümeraas, 5x EvaGreen® qPCR puhver, dNTP-d ja ROX värv) (Solis BioDyne), praimereid 2.8 µl ning ddH<sub>2</sub>O. PCR plaadile lisati igat proovi (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=2 ja *wt* n=2) kolme kordusena. Katset viidi läbi kaks korda. *Ric8* ekspressioonitaseme määramiseks leiti suhe referentsgeeniga – *HPRT* (hüpoksantiin guaniin fosforibosüül transferaas). *Ric8* mRNA suhteline ekspressiooni tase arvutati  $\Delta\Delta C_t$  meetodi põhjal (Pfaffl jt., 2001) ning statistiliseks analüüsiks teostati *Student's t-test* (Microsoft Excel)

Kasutatud qRT-PCR programm:

95°C 12 minutit

95°C 15 sekundit } 40 tsüklit

60°C 1 minut

### 2.2.6. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte fenotüübi analüüs

#### 2.2.6.1. Viljakuse hindamine

Viljakuse edukuse ja järglaste arvukuse hindamiseks võeti vaatluse alla *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=13) ja *wt* (n=15) isased. Hiired olid kahes vanusegrupis: 3–5 kuused (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=7; *wt* n=7) ja 9–11 kuused (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=3; *wt* n=5). Isastele hiirtele pandi puuri juurde kahekaupa emased hiired ning jälgiti 3 päeva jooksul. Paaritumisakti kinnitas vaginaalkorgi olemasolu.

Juhul kui emastel hiirtel kolme päeva jooksul vaginaalkorki ei tekkinud, siis vahetati emane hiir välja uue vastu. Kokku oli iga isase hiirega maksimaalselt kuus emast hiirt (Noormets jt., 2009). Kui vaginaalkork oli detekteeritav, siis pandi emane hiir eraldi puuri jälgimisele ning fikseeriti hiire kaal vaginaalkorgi tekkimise päevast (E0.5) alates ning vastavalt E8.0; E11.5; E14.5 ja E17.5 arengupäeval, et välja selgitada võimalik embrüonaalne letaalsus (kaalu järsk langus). Lisaks fikseeriti sündinud pesakonna suurus, hiirepoegade sugu ja perinataalne ning postnataalne letaalsus.

#### **2.2.6.2. Embrüote analüüs**

Varajaste blastotsüstide analüüsimiseks ristati isaseid *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiiri (n=3) *wt* emastega (n=6). Sarnaselt ristati kontrolliks 3 *wt* isast ja 6 *wt* emast looma. 3.5 päeva pärast vaginaalkorgi ilmumist emased hiired ohverdati ning pesti PBS-ga munajuhadest välja lõigustumisstaadiumis olevad embrüod, mis fikseeriti 4% PFA/PBS-s, seejärel pesti PBS-s ning pildistati.

Võimalike embrüonaalsete anomaaliade hindamiseks *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste hiirte järglaste seas uuriti kolme pesakonda (saadud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste ja *wt* emaste paaritamisest) vanuses E10.5. Embrüod dissekteeriti jahedas PBS-is ja fikseeriti 4% PFA/PBS lahuses 12h 4°C juures. Seejärel pesti 2 x 10 minutit PBS-is ning pildistati.

#### **2.2.6.3. Testiste histoloogiline analüüs**

##### **2.2.6.3.1. Parafiinlõikude valmistamine**

Täiskasvanud isaste katseloomade testised ja munandimanused dissekteeriti jahedas PBS-is ja fikseeriti 4% PFA/PBS-is 12h 4°C juures, seejärel pesti 2 korda PBS-s. Nooremate isendite (P7) puhul toimus fikseerimine 6h jooksul. Fikseeritud kudede dehüdreerimiseks kasutati kasvava kontsentratsiooniga etanoolirida: 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96% ja 2 x 100 % (kudesid hoiti

kõigis lahjendustes 24h (v.a. P7 loomade koed, mida hoiti 12h). Peale veetustamist töödeldi kudesid 2 korda 2h küüloomis toatemperatuuril. Edasi hoiti neid 1h 60°C juures olevas parafiinis ja seejärel inkubeeriti uuesti 60°C olevas parafiin-vannis 3 h. Lõpuks sisestati kude parafiiniblokki ja jahutati külmaplaadil. Parafiiniplokke säilitati kuni lõikamiseni 4°C juures. Testistest ja munandimanustest tehti mikroomiga Ergostar HM-200 (Thermo Scientific Microm) 7 µm parafiinlõigud, mis asetati alusklaasidele (SuperFrost Plus, Thermo scientific) ning säilitati kuni immunohistokeemilise töötluseni 4°C juures.

#### *2.2.6.3.2. Külmpkoelõikude valmistamine*

Katseloomadelt dissekteeritud testised fikseeriti 4% PFA/PBS-s, vastavalt vanusele – 2h (P3) või 24h (täiskasvanud) jooksul 4°C juures. Seejärel pesti testiseid PBS-ga ning asetati 30% sahharoosi lahusesse (1 x PBS-s) 48h 4°C juurde. Seejärel asendati lahus 30% sahharoosi ja OCT (Optimal Cutting Temperature compound) (Electron Microscopy Sciences) 1:1 seguga ja 12h möödumisel sisestati testised külmutussegu OCT-d sisaldavatesse vormidesse. Külmutamisel kasutati vedelat lämmastikku ja koeproove hoiti lõikamiseni -80°C juures. Testistest tehti SLEE Cryostat Mnt. krüotoomiga 20-40 µm paksused koelõigud ning need kanti Menzel Gläzer SuperFrost Plus alusklaasidele. Kambri temperatuur testiste lõikamisel oli -12 – (-15) °C.

#### *2.2.6.3.3. Araldiidi lõikude valmistamine*

Katseloomadelt (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=4; *wt* n=4) dissekteeritud testiseid fikseeriti 4% PFA/PBS-is 12h 4°C juures. Dehüdreerimiseks kasutati kasvava kontsentratsiooniga etanoolirida (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2x 100%), igas lahuses hoiti kude 24 tundi 4°C juures. Järgnevalt töödeldi testiseid atsetooniga 15 minutit toatemperatuuril ja seejärel 3 tundi atsetooni-araldiidi segus (vahekord 1:1). Lõpuks hoiti testiseid üleöö puhtas araldiidis. Koed sisestati polümeriseerimiseks blokkidesse: esmalt 24 tunniks 37 °C juurde ning siis 24 tunniks 58 °C juurde. Mikroomiga 2050 Supercut (Reichert-Jung) lõigati testistest 1.5–2 µm paksused lõigud, mis värviti metüüleensinisega 10 minutit ja seejärel pesti ddH<sub>2</sub>O-ga. Sulundamiseks kasutati

Kanada palsamit (Sigma- Aldrich). Pärast kuivamist kinnitati katteklaasi servad läbipaistva küünelakiga.

#### 2.2.6.3.4. Koelõikude immunohistokeemiline analüüs

Koelõikude adhereerumiseks kuumutati parafiinlõikudega (vt. § 2.2.5.4.1) klaase termoplokil 60°C juures 30 min. Parafiini eemaldamiseks leotati parafiinlõike 2 korda 5min ksüloolis. Rehüdreerimiseks tehti koelõikudele kahanev etanoolirida – 100% 2 x 5 min, 96% 2 x 1min, 90% 2 x 1 min, 80% 2 x 1 min, 70% 2 x 1 min, 50% 2 x 1 min, lõpuks 2 x 5min ddH<sub>2</sub>O. Seejärel hoiti koelõike kuumaveevannis, 10mM naatrium-tsitraat puhvris (pH 6.0) 30 minutit 97 °C juures – immunogeensuse taastamiseks – ning jahutati 30 min. toatemperatuuril. Lõike permeabiliseeriti 0.1 % TritonX-100 (Sigma Aldrich) PBS-is 20 min. Antikehade spetsiifilise seondumise tagamiseks blokeeriti koelõike 5% kitseseerumiga/ 1% veise seerumi albumiin (BSA, Sigma-Aldrich)/ PBS-is toatemperatuuril, niiskuskambris 1 tunni jooksul. Järgnevalt inkubeeriti koelõike üleöö 4°C juures vastavate küülikus toodetud primaarsete antikehadega (Tabel 1). Mitteseondunud antikeha eemaldamiseks pesti lõike PBT-ga (1xPBS, millele lisati 20% Tween 20 detergenti (Sigma Aldrich)), 3 x 10 min. Seejärel inkubeeriti kõiki koelõike Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud sekundaarse antikehaga (Invitrogen), lahjendusega 1:800 1%BSA/PBS-is, 1 tund toatemperatuuril. Seondumata antikeha eemaldamiseks pesti koelõike 3x10 min PBT-ga. Tuumad visualiseeriti DAPI-ga (4,6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich), lahjendusega 1/1000 1x PBS-is, mida hoiti klaasidel 3 minutit. Seejärel pesti 1x PBS-ga 2x 5 minutit ja 1 x ddH<sub>2</sub>O-ga. Fluorestsentsi säilitamiseks sulundati preparaadid Fluoroshield (FluoroshieldTM, Sigma-Aldrich) sulundusvedelikuga ja kaeti katteklaasiga, mille servade kinnitamiseks kasutati läbipaistvat küünelakki.

Tabel 1. Immuunohistokeemilises analüüsis kasutatud anti kehad

Primaarne anti keha, kasutatud lahjendus	Sekundaarne anti keha, kasutatud lahjendus	Milleks kasutati
G $\alpha_{i1+2}$ (Abcam; Ab3522) 1/200	Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud anti kehaga (Invitrogen); 1/800	RIC8 interaktsiooni partneri G $\alpha_{i1/2}$ lokaliseerimise ja ekspressiooni vaatlemiseks testistes
Anti-Laminin (Sigma-Aldrich; L 9393) Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud anti kehaga (Invitrogen)	Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud anti kehaga (Invitrogen); 1/800	Basaalmembraani markeerimiseks täiskasvanud ja P6 testise väänilistes seemnetorukestes
Phospho-S-3 (Abcam; Ab5176) Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud anti kehaga (Invitrogen)	Alexa Fluor 555 konjugeeritud küüliku IgG vastase kitses tehtud anti kehaga (Invitrogen); 1/800	Väänilistes seemnetorukestes paiknevate mitoosis olevate rakkude hindamiseks

## 2.2.7. Spermide analüüs

### 2.2.7.1. Hiirtelt spermide eraldamine ja in vitro kapatsitatsioon

Katseloomadeks olnud isastelt hiirtelt dissekteeriti testised ja munandimanused, millelt eemaldati rasvkude ning pesti soojas 37°C PBS-s. Seejärel kaaluti testised ja munandimanuse pea ning keskosa analüütilise kaaluga. Munandimanuse sabaosad asetati 1 ml eelsoendatud (37 °C) HTF

(*Human tubular fluid*, Millipore) söötmesse 3cm Ø Petri tassile. Spermiide kättesaamiseks munandimanustest, tehti neisse mikrokääridega kuni 6 korrapärast sisselõiget ja inkubeeriti 7 minutit 37 °C. Seejärel koguti välja ujunud spermid kokku ja eemaldati koetükid. 1ml spermidest võeti väike kogus (10µl) arvukuse hindamiseks, (40 µl) spermide morfoloogiliseks hindamiseks, (150 µl) Western blot analüüsiks, (60 µl) immuunotsütokeemiliseks analüüsiks, (50 µl) FACS-ks ja (4 µl) spermide liikuvuse määramisel kasutatava CASA analüüsiks (CASA analüüsi antud magistritöö ei käsitle). Spermide *in vitro* kapatsitatsiooniks asetati HTF söötmes olevad spermid 1.5 ml (Eppendorf) tuubi ning inkubeeriti neid 2h 37 °C juures (tuub oli ~45 ° nurga all).

#### **2.2.7.2 Spermide arvukuse hindamine**

Munandimanuse sabaosast eraldatud spermide arvukuse hindamiseks kasutati hemotsütomeetrit (Gorjaev *camera model* 851). Uuritavast proovist võeti 10 µl sperme, mille fikseerimiseks kasutati samas koguses 4% PFA-d ning vastavat segu pipeteeriti loendamiskambris 10 µl. Rakke loendati kambris vähemalt 200 ning valemi  $N \cdot d \cdot C$  põhjal arvutati spermide arv 1 ml-s. Valemis tähistab N loetud rakkude keskmist arvu hemotsütomeetri ühes väikese ruudus (pindala 0.0025 mm<sup>2</sup> ja ruumala 0.25 nl), d on lahjendustegur ja C hemotsütomeetri konstant ( $4 \cdot 10^6$ ).

#### **2.2.7.3. Western blot analüüs**

Western blot analüüsiks kasutati munandimanusest eraldatud sperme (150 µl, ca  $25 \cdot 10^6$  /ml; vt 2.2.7.1). Söötme eemaldamiseks tsentrifuugiti spermid (1500 g, 2 minutit) ning eemaldati supernatant. Saadud sademele lisati 50 µl 2x SDS Laemmli puhvrit ja proove säilitati –80°C juures. Proovid sonikeeriti (4 x 30 sekundit) ja kuumutati (5 minutit 96 °C juures) ning teostati SDS-PAGE geelelektroforees kasutades 10% lahutavat polüakrüülamiidgeeli järgides standardprotokolli (Tabel 2). Geelile kanti 1 miljon spermirakku proovi kohta *wt* (n=2) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=2) eraldatud hiirtest. Järgnevalt kanti valgud nitrotselluloosmembraanile (Immobilon<sup>TM</sup> Transfer Membranes, Millipore) (1.5 h 60 mA). Membraani blokeeriti 10% NFDM'i (Non-Fat Dry Milk) TBS-i lahuses (1 h toatemperatuuril) ning inkubeeriti hiires valmistatud Ga<sub>1/2</sub> vastase (Abcam) antikehaga üleöö 4° C juures (1:800 1% NFDM/ TBS



lahuses). Seejärel pesti membraani 1x TBS lahusega 4x 5 minutit ja inkubeeriti aluselise fosfataasiga konjugeeritud hobuses valmistatud hiire IgG vastase sekundaarse antikehaga (Vector laboratories, 1:2500 1% NFDm/TBS lahuses 1 tund toatemperatuuril). Membraan pesti 1x TBS lahusega 4x 5 minutit. Tulemuste visualiseerimiseks inkubeeriti membraani aluselise fosfataasi puhvri (100 mM NaCl; 100 mM Tris pH 9,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; ddH<sub>2</sub>O), BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (50 mg/ml) ja NBT (Nitro Blue Tetrazolium) (50 mg/ml) substraadi lahuses, reaktsioon lõpetati hoides membraani 5 minutit ddH<sub>2</sub>O-s ning membraan skanneeriti (Epson Perfection V700 Photo, Epson). Tulemused kvantifitseeriti kasutades arvutiprogrammi ImageJ.

Tabel 2. Polüakrüülamiidgeeli valmistamine.

<b>Materjalid</b>	<b>10%</b>	<b>4%</b>
30% akrüülamiid	1.33 ml	333 µl
1.5 M Tris/Tric	pH 8.8 (1/4) – 1 ml	pH 6.8 (1/8) – 312 µl
10% SDS	(0.1 %) – 40 µl	(0.1 %) – 25 µl
Milli-Q vesi	1.63 ml	1. 83 ml
APS	40 µl (1:100)	25 µl (1:100)
TEMED	4 µl (1:1000)	2.5 µl (1:1000)
Kokku	4 ml	2.5 ml

#### **2.2.7.4. Immuunotsütotokeemiline analüüs**

Immuunotsütotokeemilisel analüüsil kasutatud hiire spermid olid eelnevalt töödeldud vastavalt 2.2.7.1. kirjeldatud meetodile. Adhesiivsetele alusklaasidele (Thermo Scientific, Polysine® slides, Menzel-Gläser) lisati 60 µl proovi, mis sisaldas 30 µl söötmes olevaid sperme (kap+; kap-) ja fikseerimiseks lisatud võrdväärses koguses (30 µl) 4% PFA/PBS-is. Rakkude ühtlaselt klaasile paigutamiseks tõmmati proov ettevaatlikult katteklaasiga laiali ning lasti kuivada 30 minuti jooksul toatemperatuuril. Preparaate säilitati 4° C juures.

Enne edasist töötlust pesti klaase 3 x 5 min PBS-iga. Spermide permeabiliseerimiseks töödeldi neid 0.01% Triton X-100/PBS lahusega 3x 5 minutit. Järgnevalt hoiti 10 minutit 0,1% Triton X-100/PBS lahuses ning pesti PBS-ga 3x 5 minutit. Selleks, et vältida antikeha ebaspetsiifilist seondumist, inkubeeriti preparaate 1% veise albumiini seerumi (BSA, Sigma-Aldrich)/PBS lahusega, mis sisaldas 5% seerumit – niiskuskambris 1 h toatemperatuuril. Seejärel inkubeeriti preparaate primaarse kitses valmistatud anti-Ric8 (Abcam Ab24383), lahjendusega 1/30 1% BSA/PBS-lahuses üleöö 4° C juures niiskuskambris. Negatiivsetel kontrollidel kasutati primaarse antikeha asemel 1% BSA/PBS lahust. Preparaate pesti 3 x 10 minutit 1xPBT-ga. Seejärel inkubeeriti preparaate sekundaarse antikehaga Alexa fluor 555 konjugeeritud küülikus tehtud kitse IgG vastast antikeha, lahjendatuna 1:800 1% BSA-s, 1 h toatemperatuuril pimedas niiskuskambris ning pesti 1x PBT-ga 3x 10 minutit. Preparaatidel olevate rakkude tuumade visualiseerimiseks kasutati 1:1000 lahjendusega DAPI-it (4,6-diamidino-2-fenüülindool, Sigma Aldrich) 1x PBS-is, mida hoiti klaasidel 3 minutit. Seejärel pesti 1x PBS-ga 2x 5 minutit ja 1 x ddH<sub>2</sub>O-ga. Fluorestsentsi säilitamiseks sulundati preparaadid Fluoroshield (Fluoroshield<sup>TM</sup>, Sigma-Aldrich) sulundusvedelikuga ja kaeti katteklaasiga, mille servade kinnitamiseks kasutati läbipaistvat küünelakki.

#### ***2.2.7.5. Spermide morfoloogia hindamine***

Spermide morfoloogia analüüsiks eraldati rakud 2.2.7.1. kirjeldatud meetodil. Need fikseeriti võrdväärse koguse 4% formaldehüüdiga ning vaadeldi faaskontrast mikroskoobiga. Iga isendi kohta hinnati vähemalt 200 spermi.

Spermide defetide tuvastamiseks vaadeldi ja hinnati järgmiseid morfoloogilisi näitajaid, mida oli eelnevalt kirjanduses kirjeldatud (Kawai jt., 2006)

1. pea kuju – normaalne / ebanormaalne
2. tsütoplasma tilgake – puudu / väike / suur
3. saba asend – sirge / proksimaalne / distaalne

#### **2.2.7.6. *Spermi kromatiini struktuuri analüüs – SCSA***

Spermides paikneva DNA terviklikkuse määramiseks viidi läbi kromatiini struktuuri analüüs – SCSA (sperm chromatin structure assay). Spermide rakususpensioonist TNE puhvris (0,01 M Tris-HCl; 0,15 M NaCl; 1 mM EDTA; pH 7.4) kontsentratsioon 1-2 miljonit/ml võeti analüüsiks 200 µl. Sellele lisati 400 µl happe-detergendi lahust (0.08 N HCl, 0.15M NaCl, 0.1% Triton-X 100; pH 1.2) ja inkubeeriti 30 sekundit jääl. Seejärel lisati 1.2 ml AO värvilahust (0.1 M citric acid, 0.2 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.15 M NaCl; pH 6.0, 4,5µg/ml akridiinoranž), oodati 3 minutit. Seejärel mõõdeti voolutsütomeetriaga igast proovis 10<sup>4</sup> spermi fluorestsentsi intensiivsus lainepikkustel 530/30nm ja 695/40nm. (Evenson jt., 2000)

#### **2.2.8. Mikroskoopia, rakkude ja koelõikude pildistamine**

Embrüote dissekteerimisel ning analüüsil kasutati binokulaari Olympus SZX12, kaameraga Olympus XC50. Histoloogiliste preparaatide analüüsimisel kasutati valgusmikroskoopi Olympus BX51 (Olympus) ja kaamerat DP71 (Olympus). Immuunoflourestsents analüüsiks histoloogilistel preparaatidel kasutati ka konfokaalmikroskoopi Olympus FluoView 1000 (Olympus) ning pilditöötlustarkvara FV 1000 Viewer (Olympus). Fluorokroomi Alexa Fluor 555 ergastamiseks kasutati laserit 559nm ja DAPI ergastamiseks laserit 405 nm. Spermide morfoloogiliste preparaatide pildistamisel kasutati lisaks valgusmikroskoopiale ka faaskontrastmikroskoopiat (Olympus BX51 (Olympus Corporation)).

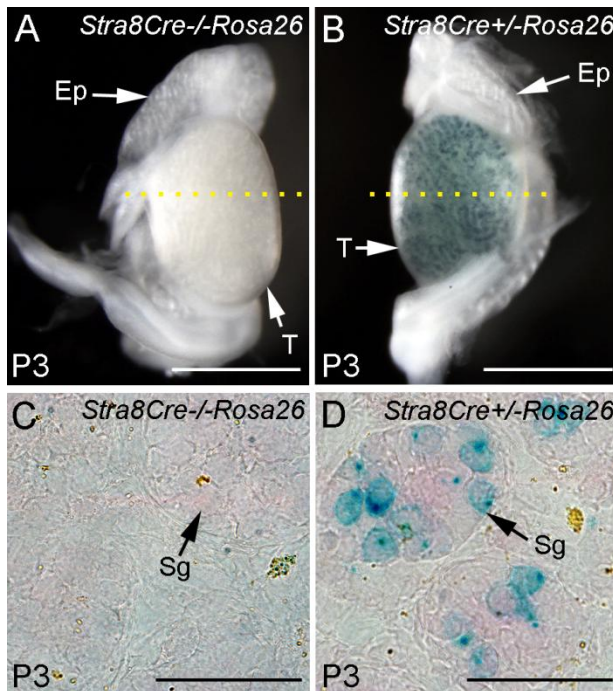
Spermide liikuvuse ja morfoloogilisel analüüsil kasutati mikroskoopi SpermVision™, Minitübe, Germany. Piltide järeltötluseks ja dokumenteerimiseks kasutati arvutiprogrammi Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems).

### 3. TULEMUSED

#### 3.1. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiireliini tekitamine ja analüüs

##### 3.1.1. *Stra8Cre* transgeeni ekspressiooni kontroll

*Stra8Cre* (Tg(*Stra8-icre*)1Reb/J) on transgeenne hiireliin, kus *Cre*-rekombinaasi ekspressioon on suunatud spermatogoonide spetsiifilise *Stra8* promootori poolt. Kui *Stra8Cre* isaseid hiiri paaritada uuritavas geenis loxP järjestusi sisaldava emase hiirega, siis lõigatakse vastav geeni fragment spetsiifiliselt, alates postnataalsest vanusest P3 (varane spermatogoonide staadium) välja, mistõttu on see liin sobilik hiire postnataalse premeiootilise spermatogeneesi uurimiseks (Sadate-Ngatchou jt., 2008). Selleks, et kontrollida *Stra8Cre* koespetsiifilist ekspressiooni enne suuremahulist ristamist *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade tekitamisel, ristati *Stra8Cre* transgeenseid isaseid loomi *Rosa26<sup>lox/lox</sup>* emaste reporterloomadega (§ 2.2.2.) saades *Stra8Cre;Rosa26<sup>lacZ/lacZ</sup>* (edaspidi *Stra8Cre<sup>+/+</sup>Rosa26*) järglased vanuses P3, kellele teostati X-gal värvusreaktsioon. Vastsündinud (P3) isaste *Stra8Cre<sup>+/+</sup>;Rosa26* loomade testised värvusid siniseks võrreldes *Stra8Cre<sup>-/-</sup>;Rosa26<sup>lox/lox</sup>* (edaspidi *Stra8Cre<sup>-/-</sup>Rosa26*) loomade testistega mida kasutati kontrollina (joonis 4A ja B). *Stra8Cre* ekspressiooni täpsemaks kirjeldamiseks tehti testistest ristlõigud, millelt oli selgelt detekteeritav X-gal värvusreaktsioon ainult väänilistes seemnetorukestes arenevate spermatogoonide tuumades (joonis 4C ja D). Sertoli rakkudes ja interstitsiaalsetes rakkudes värvusreaktsioon puudus. X-gal värvusreaktsioon ei olnud detekteeritav ka munandimanuses (joonis 4A ja B). Lisaks kontrolliti X-gal värvusreaktsiooni isaste *Stra8Cre;Rosa26<sup>lacZ/lacZ</sup>* loomade mõningates organites (maks, neerud ja kõrv), kus värvusreaktsioon ei olnud tuvastatav. Kokkuvõtvalt näitasid need tulemused, et *Stra8Cre* transgeeni ekspressioon vastas varasemalt kirjanduses toodud andmetele ning on sobilik spermatogeneesi uurimiseks.

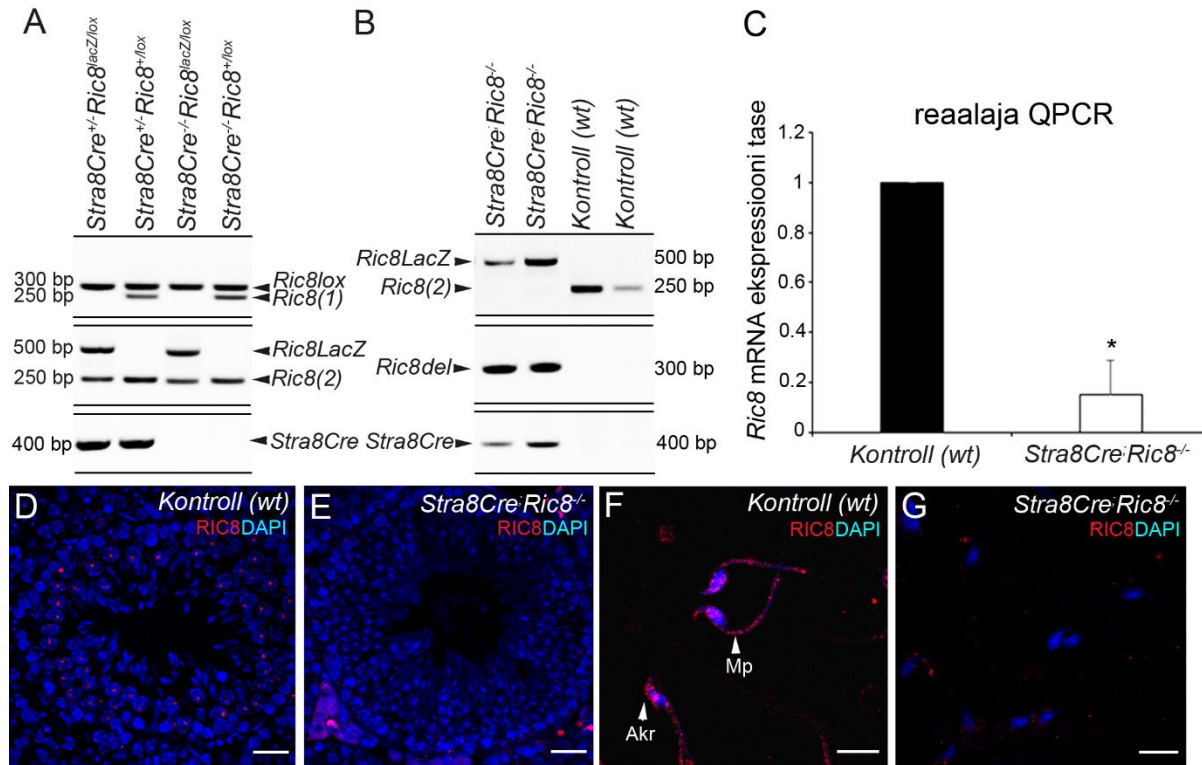


Joonis 4. *Stra8Cre* transgeeni ekspressiooni kontroll *Rosa26* hiireliiniga vanuses P3. (A, C) X-gal värvusreaktsioon kontrollina kasutatud *Stra8Cre<sup>-/-</sup>Rosa26* ja (B, D) *Stra8Cre<sup>+/-</sup>Rosa26* hiirtel. (A, B) Testis koos munandimanusega. Kollane katkendlik joon näitab millises tasapinnas tehti lõigud, mis on esitatud vastavalt piltidel (C, D). (C, D) Testise ristlõik, millel on vaadeldavad väänilised seemnetorukesed ja intertubulaarne sidekude. Lühendid: Ep, epidididum e. munandimanus; Sg, spermatogoon; T, testis e. munand. Mõõtlõik: (A, B) 1 mm ja (C, D) 50 µm.

### 3.1.2. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiireliini tekitamine

Antud töös kasutati laialt kasutatavat Cre-lox süsteemi, et välja lülitada spetsiifiliselt arenevatest seemnerakkudest (spermatogoonidest) *Ric8*. Selleks tekitati esmalt topeltheterosügootsed *Stra8Cre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>laz/+</sup>* loomad, kellel Cre-rekombinaasi avaldumine on kontrollitud *Stra8* promootori poolt ning *Ric8* ühel alleelil on neli esimest eksonit asendatud *LacZ* geeniga (seetõttu sealt *Ric8* mRNA-d ei toodeta), mille avaldumine on kontrollitud *Ric8* promootoriga. *Stra8Cre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>laz/+</sup>* isaste loomade ristamisel *Ric8<sup>lox/lox</sup>* emastega tekitati *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiired, kellel on spetsiifiliselt tänu *Stra8Cre*-rekombinaasi aktiivsusele ja *LacZ knock-in* süsteemile *Ric8* alates P3 arengustaadiumist arenevatest seemnerakkudest välja lülitatud (haploidsetes spermides on *Ric8* välja lülitatud erinevalt: kas Cre/lox süsteemiga või *LacZ knock-in* süsteemiga, mistõttu

funktsionaalset RIC8 valku ei sünteesita). Genotüpiseerimistulemused (joonis 5A) näitasid, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiired olid võimelised sündima ja nende hulk pesakonnas oli vastavuses Mendeli lahknepuseadusega. Selleks, et kontrollida kas rekombinatsioon on *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste sugurakkudes toimunud, teostati spermidest eraldatud genoomse DNA-lt alleelspetsiifiline PCR, millega amplifitseeriti vastavad *Ric8* fragmendid. Rekombinaas oli *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel lõiganud *Ric8* 5 esimest eksonit välja ning seetõttu amplifitseerus 322 bp produkt, samas *wt* loomadel sellist produkti ei teki (tekib 2500 bp) (joonis 5B). Järgnevalt kontrolliti kas suhteline *Ric8* mRNA tase on vähenenud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel. Selleks eraldati täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade (n=3) ja *wt* loomade (n=3) testistest mRNA, millelt sünteesiti cDNA ja viidi läbi kvantitatiivne reaalaaja PCR. Suhteline *Ric8* mRNA ekspressioonitase *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja kontrollgrupi hiirtel leiti  $\Delta\Delta C_t$  meetodil (Pfaffl, 2001), kus referentsgeeniks valiti *Hprt*. Analüüsi tulemusena selgus, et suhteline *Ric8* mRNA tase on *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* testistes võrreldes kontrollidega ligikaudu 10 x madalam (joonis 5C). RIC8 valgu taseme kontrollimiseks tehti *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* loomade testistele ja spermidele RIC8 vastaste antikehadega immunokeemiline analüüs. RIC8 valk ei olnud tuvastatav *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* testiste väänilistes seemnetorukestes arenevates sugurakkudes (joonis 5E) ning munandimanuse sabaosast eraldatud spermides (joonis 5G). Kontrolliks kasutatud *wt* loomadel oli RIC8 ekspressioon selgelt detekteeritav spermi peasas akrosomaalpiirkonnas ja vaheosas (joonis 5F) sarnaselt varem näidatud tulemustele (Pert, magistritöö 2012) ning arenevate sugurakkude tsütoplasmas (joonis 5D).



Joonis 5. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiireliini tekitamine ja kontroll. (A) Hiirte genotüpiseerimine sabaotsast eraldatud genoomse DNA põhjal alleelspetsiifilise PCR-ga. *Ric8* ja *Ric8lox* (sisaldab loxP järjestusi) alleelilt amplifitseeritud produktide (vastavalt *Ric8(1)* 271 bp ja *Ric8lox* 315 bp) vahe on 44 bp. *Ric8LacZ* produkt (490 bp) näitab, et üks *Ric8* alleel sisaldab *LacZ*. *Ric8(1)* (271 bp) ja *Ric8(2)* (276 bp) produktid on saadud erinevate praimeritega *Ric8* alleelilt. *StraCre* transgeeni tuvastab *Stra8Cre* (425bp) produkt. (B) Hiirte genotüpiseerimine spermidest eraldatud genoomse DNA põhjal alleelspetsiifilise PCR-ga. *Ric8del* produkt (322 bp) näitab, et *Stra8Cre* on olnud spermides aktiivne ja *Ric8* esimesed 5 eksonit on välja lõigatud ning *Ric8LacZ* produkti (490 bp) olemasolu, et *LacZ* on asendanud *Ric8* 4 esimest eksonit. (C) *Ric8* mRNA suhteline ekspressioon *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* testistes (n=3) on 10x langenud (p<0.05) võrrelduna kontrolltestistega (n=3) ( $\Delta\Delta C_t$  meetod). Referentsgeeni on *Hprt*. (D ja E) *RIC8* ekspressioon (punane) täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* testise väänilises seemnetorukestes olevates arenevates sugurakkudes on praktiliselt kadunud võrrelduna kontroll testistega, kus *RIC8* lokalisatsioon on selgesti detekteeritav spermatotsüütide tsütoplasmas. DAPI (sinine) visualiseerib tuumasid. (F ja G) *RIC8* (punane) immunotsütoloogiline analüüs *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja wt loomade spermidele. *RIC8* lokaliseerub wt spermides akrosoomi (Akr) ja vaheosa (Mp) piirkonnas, samas kui *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* spermides ei ole seda märgata. DAPI (sinine) visualiseerib tuumasid. Mõõtskaalad: (D ja E) 20  $\mu$ m ja (F ja G) 10  $\mu$ m.

### 3.1.3. Ric8<sup>-/-</sup> fenotüübi analüüs

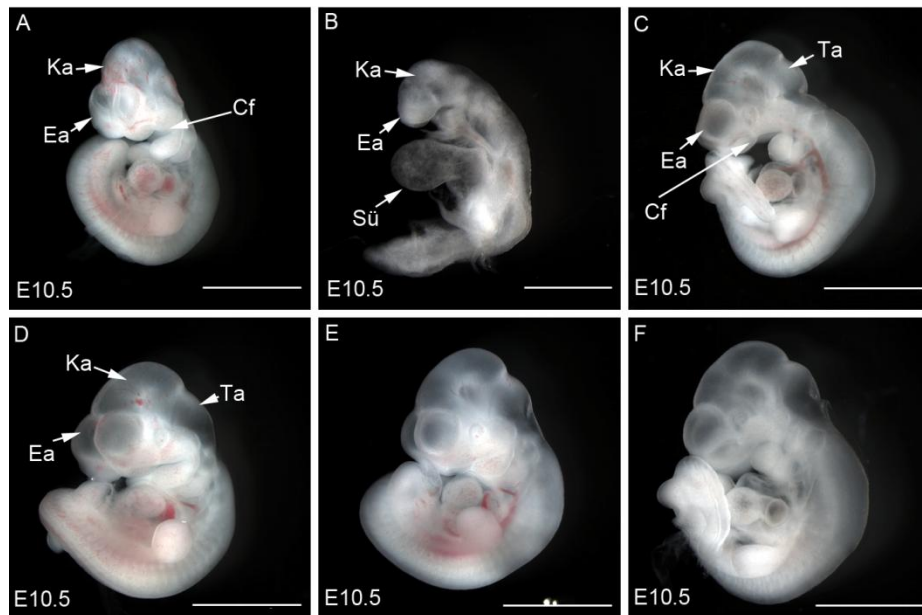
#### 3.1.3.1. Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup> hiireliini viljakuse ja järglaste fenotüübi analüüs

*Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* isased loomad olid võimelised sündima ning nad olid elujõulised ja neil ei olnud märgatavaid anatoomilisi/morfoloogilisi iseärasusi võrreldes pesakonnakaaslaste või *wild-type* kontrollloomadega. Järgnevalt iseloomustati *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* isaste loomade paaritumisaktiivsust ja viljastamisvõimet. Selleks disainiti katseskeem, mida on varasemalt analoogiliste tööde puhul kasutatud (Noormets jt., 2009). *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* (n=10) ja kontrollgrupi (n=12) isaseid paaritati *wild type* emaste hiirtega. Hiired olid jaotatud kahte vanusegruppi: 3-5 – kuused (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=7; wt n=7) ja 9-11 kuused (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* n=3; wt n=5) ning iga isane hiir oli kokku maksimaalselt kuue emase hiirega. Kopulatsiooniakti järgselt moodustunud vaginaalne limakork andis kinnitust normaalse sigimiskäitumise kohta, mille kohaselt *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel kopuleerumisega probleeme ei olnud. Vanemad 9-11 kuused *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isased (n=3) suutsid katseaja jooksul produtseerida 11 pesakonda 18 kopulatsioonist (s.o. 61,11%), samas vanemad wt loomad üllatuslikult 28 kopulatsioonist ainult 15 pesakonda (s.o. 53,57%). Samas esines kahes pesakonnas *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* järglaste seas peritnataalne letaalsus (mõlemas pesakonnas 1). Lisaks oli ka *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* pesakondade keskmine suurus väiksem (p<0,05) kui wt loomadel (vastavalt 5,7 ja 7,7 poega pesakonnas). Kui võrrelda nooremaid 3-5 – kuuseid *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* ja wt isaseid, siis antud katseperioodil mõlema grupi loomad ilmutasid vähest seksuaalset aktiivsust. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isased produtseerisid 18 limakorki, millest sündis 7 pesakonda (38,8%) ja wt puhul oli see vastavalt 10/4 (40%). Pesakonna suurus ei olnud kahe genotüübi gruppide vahel oluliselt erinev (p=0,26). *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* puhul oli see keskmiselt 7,1 ja wt 5,8 järglast. Kui võrrelda ainult genotüübi järgi *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=10) ja wt (n=15) loomi, siis statistiliselt olulisi erinevusi pesakonna suuruses (*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* keskmiselt 6,2 järglast ja wt isaste puhul 7,3 järglast pesakonnas) ei esinenud (p=0,18). Nii noorte kui vanade hiirte puhul jälgiti ka limakorgi tekkimisel emaste hiirte kaalu (vastavalt E8.0; E11.5.; E14.5. ja E17.5. arengupäeval), et fikseerida võimalikku embrüonaalset letaalsust (järsik kaalulangus). Kõikide emaste puhul, kes sünnitasid, kaaluive tõusis eksponentsiaalselt vastavalt embrüonaalsele vanusele, seega otsest viidet embrüonaalsele



letaalsusele ei tuvastatud. Samuti ei olnud kõrvalekaldeid tiinuse kestvuses päevades – mõlema genotüübi puhul juhuks kestis emase tiinus keskmiselt 19,3 päeva.

Kontrollimaks embrüonaalset fenotüüpi ja võimalike väärarenguid *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste järglastel, analüüsiti lähemalt kolme pesakonna (isaste *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* emaste ristamisel saadud embrüod) embrüote fenotüüpi E10.5 vanuses. Uuritud järglaskondades oli 8-10 embrüot, mis jääb vahemikku, mis vastab tüüpilisele *wt* järglaskonnale. Enamus E10.5 embrüotest olid normaalse fenotüübiga ja anatoomilisi-morfoloogilisi arengudefekte ei täheldatud (joonis 6D-F). Samas igas pesakonnas oli üks ebanormaalse fenotüübiga embrüo, kellel esinesid närvisüsteemi arenguhäired (neuraalitoru sulgumishäired, kitsenenud ja väiksemad ajuvatsakesed), kraniofastsiaalsed arenguhäired, arengus mahajäämus, südame defektid (joonis 6A-C).



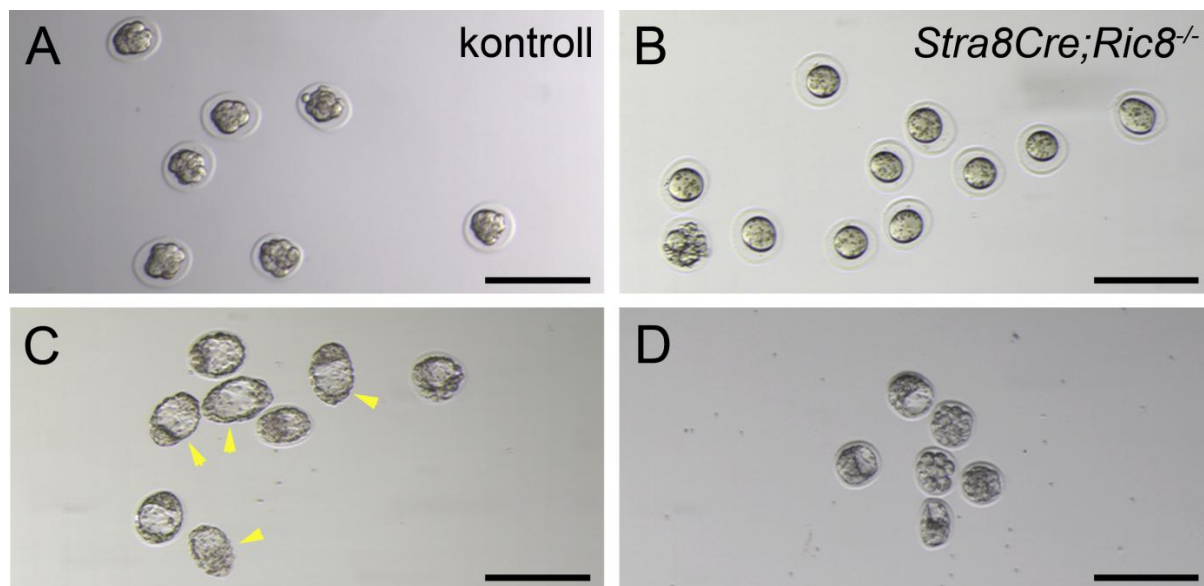
Joonis 6. *Wt* emaste ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste järglased vanuses E10.5. (A-C) Arenguhäiretega (ajustruktuuride taandareng, neuraalitoru sulgumatus, näopiirkonna arengu defektid, väiksem kasv, südame defektid) embrüod. (D-F) normaalsed pesakonnakaaslased. Lühendid: Ea, eesaju; Cf, kranio-fastsikulaarne piirkond; Ka, keskaju, Sü, süda; Ta, tagaaju. Mõõtkava: (A, C-F) 2mm ja (B) 1 mm.

*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste viljakuse edukuse määramiseks uuriti embrüoid ka vanuses E3.5. Selleks paaritati 6 *wt* emast *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isastega (n=3), kontrolliks ristati lisaks 6 *wt* emast *wt* (n=3) isastega. Analüüsi tulemusena selgus, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste järglaste puhul oli vähem

embrüoid (40,5% viljastumise edukus) ja rohkem viljastamata munarakke kui *wt* isaste puhul (97,4% viljastumise edukus) (Tabel 3). Üks *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isasega koos olnud *wt* emastest ei ovuleerunud. Keskmiselt oli embrüoid vanuse-vahemikus E2.75-E3.75 *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* järglaste hulgas 2.5 ja *wt* järglaste seas 6.1 tükki. Lisaks olid *wt* järglased mõnevõrra kiirema arenguga, mida näitab see, et E3.5 oli 23,7% embrüotest juba *zona pellucida*st koorunud blastotsüstid (Tabel 3; joonis 7C). Hinnanguliselt täheldasime, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste embrüod tundusid arengus maha jäänud või oli viljastumise protsess võtnud kauem aega. E3.5 arengustaadiumile oli jõudnud analüüsi päeval *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* grupis 66,7% embrüotest, samas kontrollrühmas olid E3.5 arengustaadiumi saavutanud 81,1% embrüotest.

Tabel 3. Isaste *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* järglaste analüüs E3.5 embrüote põhjal

	Pesakonna arv /Embrüote arv	Viljastamata munarakkude arv	Embrüote hinnanguline vanus	Koorunud blastotsüstide arv
♀ <i>wt</i> x ♂ <i>wt</i>	6/38	1	E2.75-E3.75	9
♀ <i>wt</i> x ♂ <i>Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup></i>	6/15	22	E2.25-E3.5	0



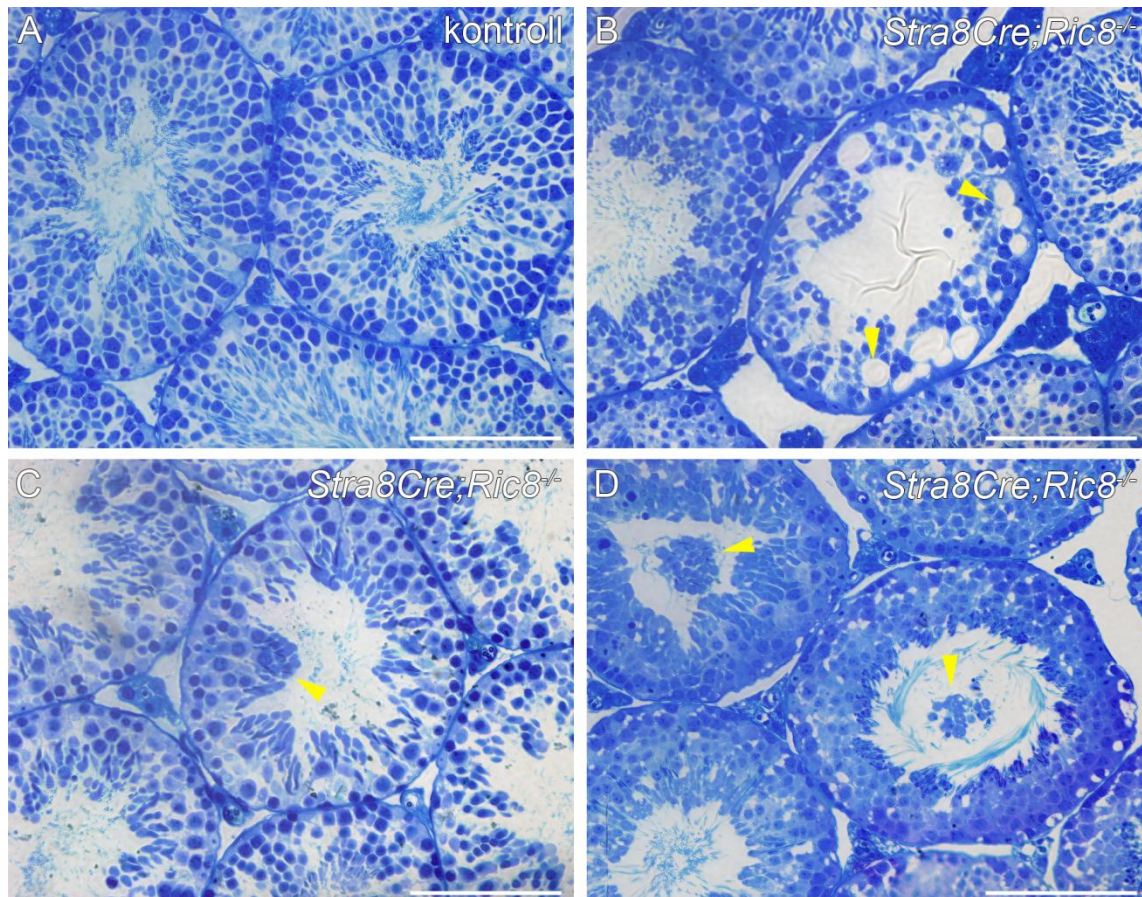
Joonis 7. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste ja *wt* emaste järglased vanuses E3.5. (A, C) *Wt* kontrollisase järglased ja (D) *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isase järglased. (B) viljastumata munarakud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* x *wt* emase paaritusest. Kollase noolepeaga on näidatud blastotsüstid, mis on juba jõudnud *zona pellucida*-st kooruda. Mõõtlõik: 200  $\mu$ m.

### 3.1.4 Testiste morfoloogia

#### 3.1.4.1. Histoloogiline analüüs

*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade (n=10) täpsemaks analüüsimiseks võrreldi nende testiste ja epididüümite (munandimanuste) morfoloogiat ning histoloogiat *wt* loomade (n=12) vastavate struktuuridega. Munandite ning munandimanuste suurus ja kaalus (keskmiselt oli kahe testise kogukaal mõlema genotüübi puhul 0,25 grammi ning epididüümite kaal oli ~ 0,06 grammi) märgatavaid erinevusi *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* loomade vahel ei täheldatud. Järgnevalt teostati histoloogiline analüüs testistest tehtud ristlõikudele. Täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade ning kontrollisaste testiste histoloogiliseks analüüsiks tehti neist histoloogilised ristlõigu-preparaadid. Analüüsi tulemusena selgus, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte väänilistes seemnetorukestes esineb mitmeid kõrvalekaldeid normaalsest morfoloogiast ja histoloogiast. Normaalse ehitusega vääniliste seemnetorukeste kõrval oli detekteeritavad laienenud valendikuga nekrootilised /atreetilised seemnetorukesed mitmete suurte vakuoolidega (joonis 8B). Iseloomulikeks häireteks

olid ka üksikud spermatiidide kogumikud luumeni äärealadel (joonis 8C) ning ebanormaalne spermatogeense epiteeli rakkude (spermatotsüüdid, ümarad spermatiidid) esinemine vääniliste seemnetorukeste valendikus (joonis 8D). Laiendatud analüüs *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* defektidest leiab kajastamist Marko Leeviku bakalaureusetöös, 2016.

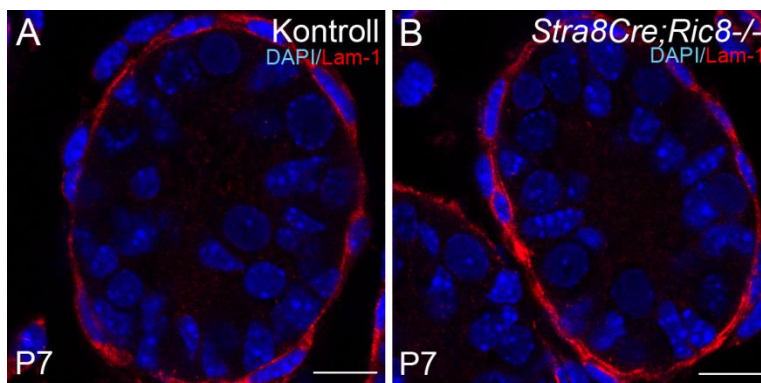


Joonis 8. **Histoloogiline analüüs *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte testistele.** (A) Normaalse morfoloogiaga kontroll isase väänilised seemnetorukesed. (B-D) *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel tuvastatud defektsed väänilised seemnetorukesed. (B) Nekrootiline/atreetiline toruke laienenud valendiku ja vakuoolidega. (C) valdavalt spermatiididest rakukogumiku paiknemine valendiku äärealal. (D) spermatogeense epiteeli rakkude (peamiselt spermatotsüüdid, ümarad spermatiidid) sattumine vääniliste seemnetorukeste valendikku (näidatud noolekestega). Mõõtlõik: 100 µm. Lõikude paksus 1.5–2 µm.

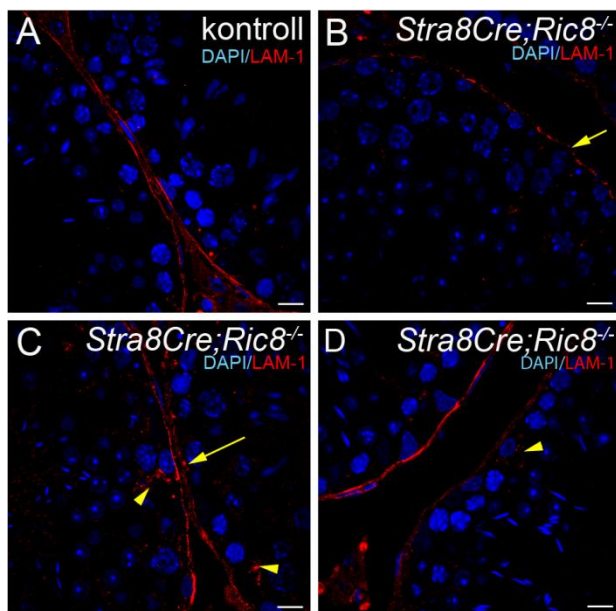


### 3.1.4.2. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte vääniliste seemnetorukeste basaalmembraani analüüs

Kuna varasemalt oli teada, et *Ric8* mutantsetes loomades esinevad basaalmembraani terviklikkuse säilimisel häireid (Tõnissoo jt., 2011; Kask jt., 2015; Ma jt. 2012), siis otsustati vaadata basaalmembraani intaktsust ka *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testistes kasutades markerina laminiin-1 vastaseid antikehi. Arenevates testistes, vanuses P7 kui spermatogoonid on liikunud basaalmembraanile, märgatavaid erinevusi BM terviklikkuses *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=2) väänilistes seemnetorukestes võrrelduna pesakonnakaaslastega (n=2; *Ric8* suhtes heterosügootsed) ei olnud ja BM tundus intaktne (joonis 9A ja B). Samas täiskasvanud testistes oli laminin-1 lokalisatsioon märgatavalt muutunud. Laminiini oli võimalik detekteerida lisaks normaalsele BM ka arenevate sugurakkude vahel kogumikena (joonis 10). Samuti oli mitmeid väänilisi seemnetorukesti, kus BM intaktsus oli häiritud (laminiini märgis katkendlik, nõrk või puudu) võrrelduna *wild type* testistega, kus laminiini lokalisatsioon markeeris terviklikku BM väänilistes seemnetorukestes (joonis 10).



Joonis 9. Laminiini lokalisatsioon hiire testiste väänilistes seemnetorukestes vanuses P7. (A) Kontroll pesakonnakaaslaste (B) *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* vääniline seemnetoruke. Laminiin 1 (Lam-1; punane) lokaliseerub vääniliste seemnetorukeste basaalmembraanis. DAPIga (sinine) on värvitud tuumad. Mõõtkava: 10  $\mu$ m.



Joonis 10. **Laminiini lokalisatsioon täiskasvanud hiire väänilistes seemnetorukestes.** (A) Laminiin 1 (LAM-1; punane) ekspresseerub ühtlase jutina markeerides seemnetorukese basaalmembraani. (B-D) Laminiin1 lokalisatsioon on osadel *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* seemnetorukestel muutunud (kollased noolepead näitavad Lam-1 arenevate sugurakkude vahel). Mitmete seemnetorukeste puhul on Lam-1 ekspressioon katkendlik või märgatavalt nõrgem (kollane nool). DAPIga (sinine) on värvitud tuumad. Mõõtkava: 10  $\mu$ m.

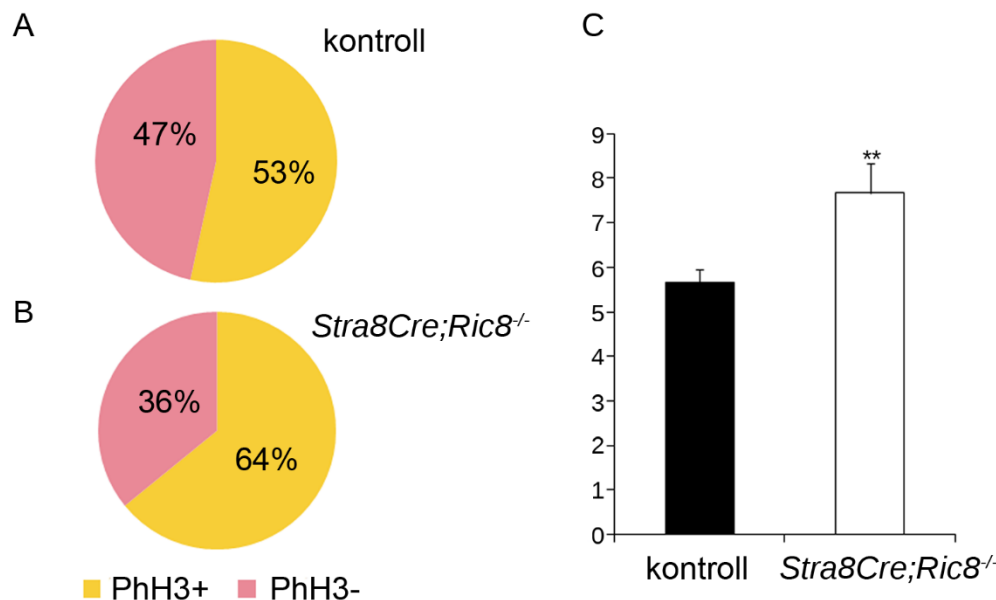
### 3.1.4.3. Mitootiliste rakkude osakaal täiskasvanud ja P7 vanuses hiirte testistes

Kuna RIC8 on seotud rakkude asümmeetrilise/sümmeetrilise jagunemisega (Miller ja Rand, 2000; Couwenbergs jt., 2004; Hampoelz jt., 2005), siis vaadeldi *Stra8Cre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade spermatogeenses epiteelis mitootilisi jagunemisi. Mitootiliselt jaguvate spermatogoonidele ja meioosi I profaasi diploteeni faasi spermatotsüütidele on iseloomulik fosforüleeritud histooni H3 (Ph-H3) ekspressioon (Mazaud-Guittot jt., 2010; Cobb jt., 1999). Mitootiliste rakkude osakaalu hindamiseks teostati immuunohistokeemiline analüüs Ph-H3 vastase antikehaga. Vaatluse alla võeti kaks vanusegruppi: P7 ja täiskasvanud (5-7 kuused) loomad.

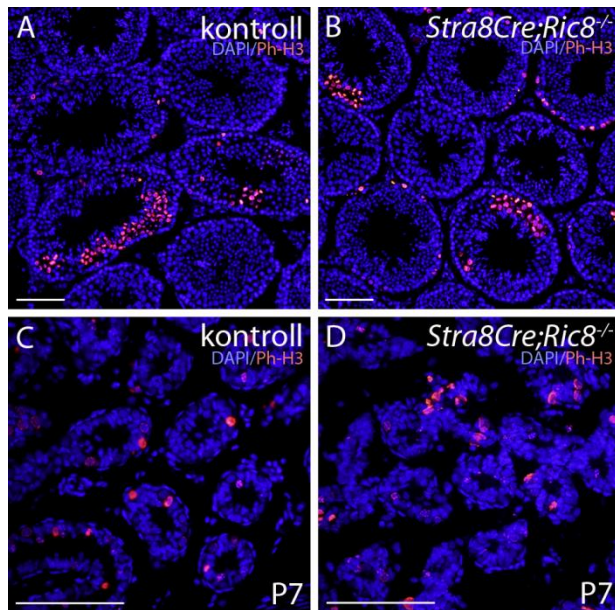
Noorematel, P7 vanustel loomadel, võrreldi mitootiliste rakkude hulka *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=2) ja pesakonnakaaslase (*Ric8* heterosügootne) (n=2) väänilistes seemnetorukestes. Mitootiliste rakkude analüüsimiseks pildistati ühe lõigu piires 50 väänilist seemnetorukest, loendati kõik neis olevad rakud ning määrati neist Ph-H3 positiivsete rakkude arv. Analüüsi tulemusena selgus, et

mitoosisis olevate rakkude osakaal väänilistes seemnetorukestes kontrolliks kasutatud pesakonnakaaslastel oli 5,6% kuid *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isendite puhul oli see kõrgem, ulatudes 7,7%-ni. Saadud tulemus oli statistiliselt oluline ( $P < 0,01$ ) (joonis 11C; joonis 12C ja D).

Täiskasvanud *wt* ( $n=2$ ) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ( $n=2$ ) hiirte testistes mitootiliste rakkude osakaalu hindamiseks loendati iga isendi kohta tehtud kolmel lõigul olevad väänilised seemnetorukesed. Ph-H3 positiivseteks hinnati vähemalt ühte positiivset rakku sisaldanud seemnetoruke nagu varasemalt on analoogiliste tööde puhul tehtud (Falender jt., 2005; Mazaud-Guittot jt., 2010). Igal lõigul oli vähemalt 46 väänilist seemnetorukest; kokku 2 isendi kohta loendati vähemalt 700 väänilist seemnetorukest. Täiskasvanute väänilisi seemnetorukeksi analüüsides leiti, et *wt* isendites oli Ph-H3 positiivseid rakke sisaldavate vääniliste seemnetorukeste osakaal veidi üle poole (53%). *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isendite puhul oli selliseid torukeksi üle 10% rohkem (64%) (joonis 11A ja B; joonis 12A ja B), ehkki saadud tulemused polnud statistiliselt piisavalt olulised ( $P=0,98$ ). Samas esines sarnane tendents P7 isenditega, kus *Stra8Cre<sup>+/-</sup>;Ric8<sup>lacZ/lox</sup>* isenditel oli oluliselt suurem mitootiliste rakkude osakaal.



Joonis 11. Mitootiliste rakkude osakaal täiskasvanud ja P7 vanuseliste hiirte testistes. Mitootilisi rakke sisaldavate vääniliste seemnetorukeste osakaal täiskasvanud *wt* (A) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (B) hiirte testistes. (C) Mitootiliste rakkude osakaal P7 vanustes kontroll ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte testistes. \*\* $p < 0,01$ .

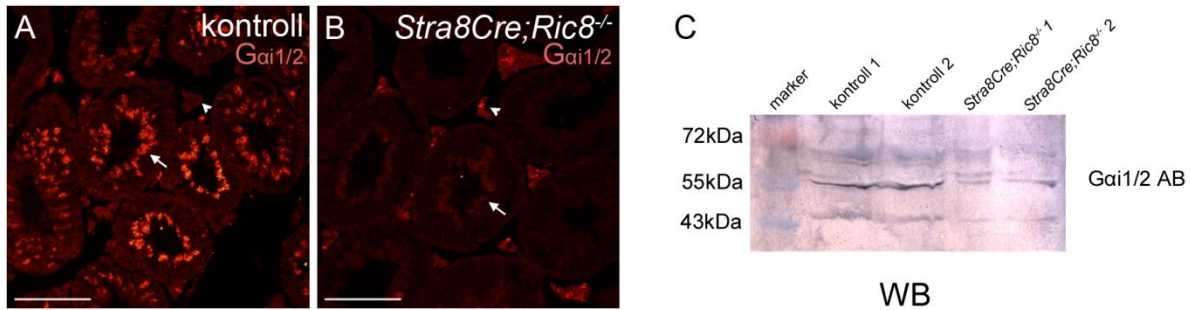


Joonis 12. Mitootiliste rakkude tuvastamine väänilistes seemnetorukestes. Täiskasvanud *wt* (A) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (B) ning P7 vanuses hiirte testised (C, D). Mõõtlõik: 100  $\mu$ m.

#### 3.1.2.4. *Gai/2* ekspressioon *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* spermides ja testistes

Kontrollimaks RIC8 puuduse mõju  $G\alpha_i$  tasemele täiskasvanud hiire spermides ja testistes, teostati Western blot ning immuunohistoloogiline analüüs, kasutades  $G\alpha_{i1/2}$  vastast antikeha. Western blot analüüsil kasutati sperme täiskasvanud *wt* (n=2) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=2) hiirtelt. Tulemustest selgus, et võrdses koguses ( $10^6$ ) spermides oli  $G\alpha_{i1/2}$  ekspressioon *wt* hiireliini spermides märgatavalt kõrgem kui *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* spermides (joonis 13C). Immuunohistokeemiline analüüs  $G\alpha_{i1/2}$  vastase antikehaga kinnitas sarnast tulemust täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* hiirte testiste väänilistes seemnetorukestes. *Wt* isendites ekspresseerus  $G\alpha_{i1/2}$  elongeeruvate spermatiidide tsütoplasmas. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel oli  $G\alpha_{i1/2}$  ekspressioon märgatavalt nõrgem, samas Leydigi rakkudes tunduvalt tugevam kui *wt* spermides (joonis 13A ja B).



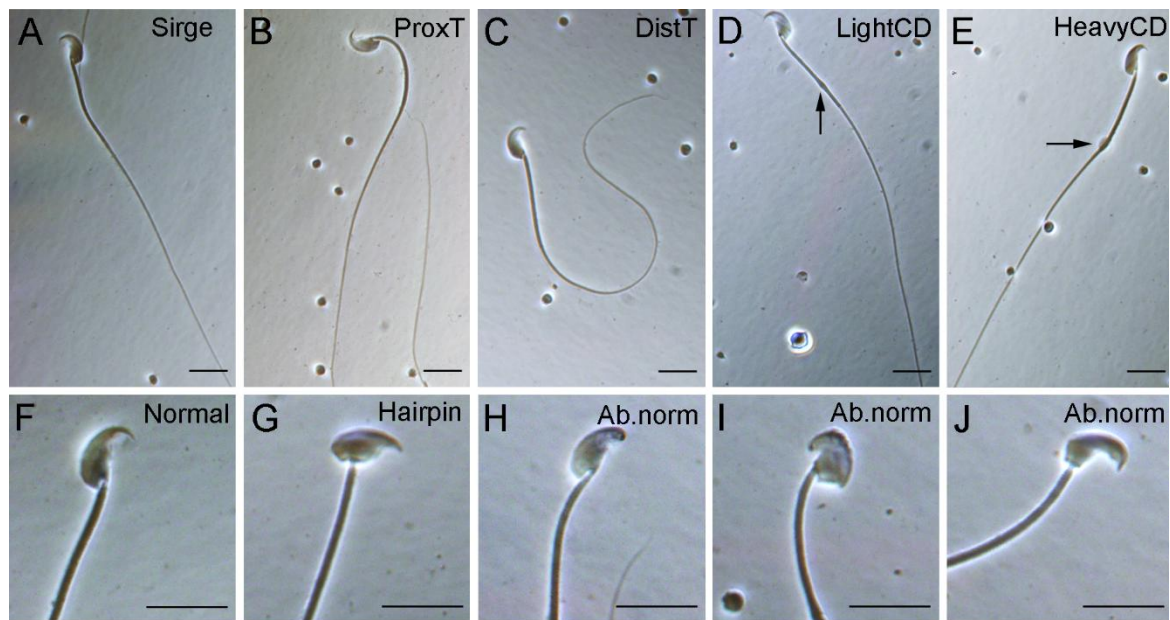


Joonis 13. Valgu  $G\alpha_{i1/2}$  ekspressioonitaseme ja lokalisatsiooni võrdlus *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* loomade testistes ja spermides. (A, B)  $G\alpha_{i1/2}$  (punane) immunohistoloogiline analüüs täiskasvanud *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* testistes. Noolega tähistatud spermatiidid, nooleotsaga Leydigi rakud. (C)  $G\alpha_{i1/2}$  ekspressiooni analüüs Western blotiga (WB) *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* spermidele. Mõõtlõik: 100  $\mu$ m.

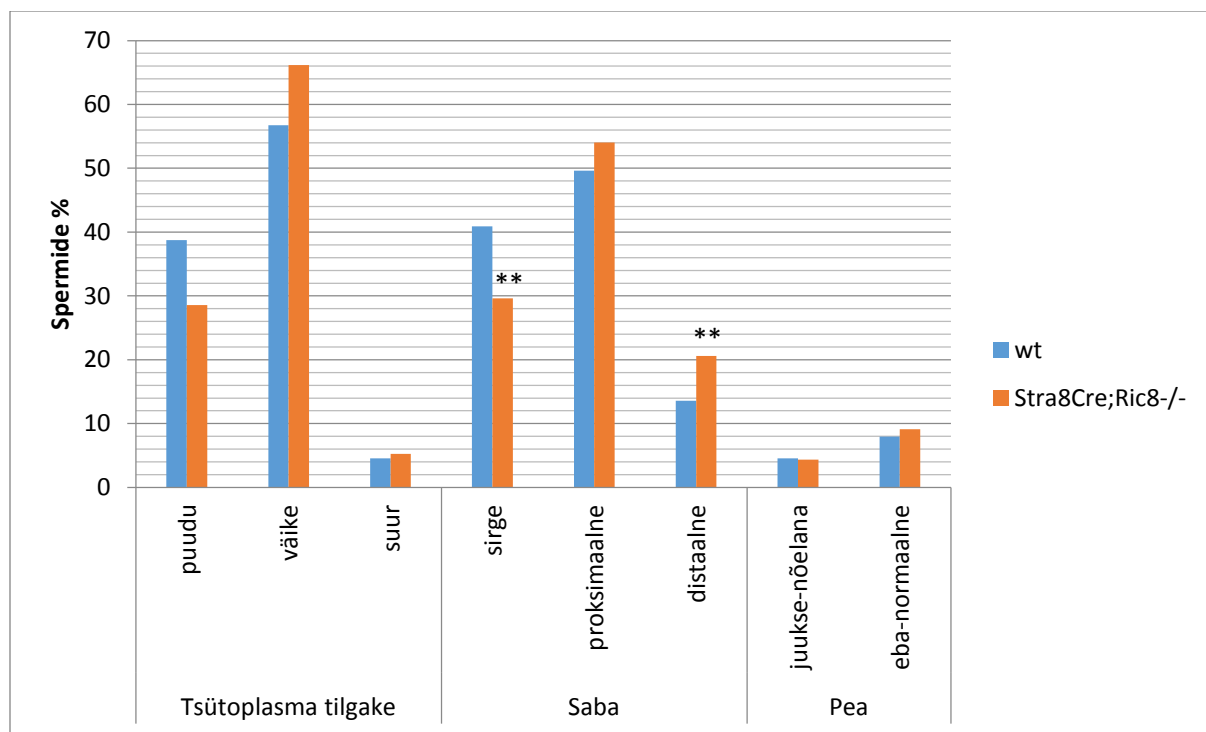
### 3.1.4.5. Sperme analüüs

#### 3.1.4.5.1. Morfoloogiline analüüs

*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade sperme analüüsiks eraldati nende munandimanuse sabaosast (*cauda epididymis*) spermid, mida võrreldi *wt* spermidega. Munandimanusest eraldatud sperme arvukuse osas märkimisväärsed erinevusi *wt* (n=12) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste (n=12) vahel ei esinenud (vastavalt keskm.  $22,16 \times 10^6/\text{ml}$  ja  $24,01 \times 10^6/\text{ml}$ ). Sperme morfoloogia hindamiseks analüüsiti iga isendi kohta vähemalt 200 spermi nii *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* kui ka *wt* grupis. Jälgiti pea kuju (joonis 14F-J), tsütoplasma tilgakese olemasolu ja selle suurust (joonis 14D ja E) ning saba asendit (joonis 14A-C). Statiliselt olulised ( $P < 0,01$ ) erinevused ilmnescid *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade puhul saba asendiga seotud tunnustes, distaalset sabakõverust (joonis 14C; joonis 15) oli neil rohkem ja normaalsetele spermidele iseloomuliku sirge sabaga sperme oluliselt vähem kui *wt* hiirtel (joonis 14A; joonis 15).



Joonis 14. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ja *wt* loomade spermide morfoloogilisel analüüsil vaadeldud tunnused. (A) normaalne sirge saba, tsütoplasma tilgakeseta ja normaalse peaga sperm. (B, C) kõverdunud sabaosaga sperm: proksimaalses piirkonnas vaheosas (ProxT) kumerus; distaalselt (DistT) kõverdunud sperm (kõverus pärast vaheosa). Väikese (D) ja suure (E) tsütoplasma tilgakesega (osutatud nooltega) spermid. (F-J) spermi peapiirkonna erinevad morfoloogiad. (F) – normaalne peakuju; (G) pea nõ. juuksenõela kujuline, kaelast kõverdunud; (H-J) ebanormaalsete peakujudega spermid. Mõõtlõik: 10  $\mu$ m.

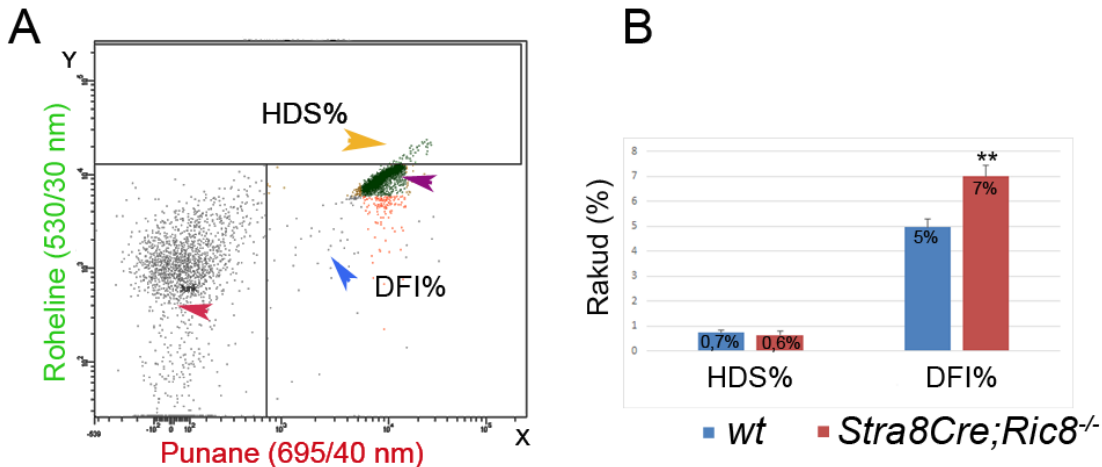


Joonis 15. *Wt* ja *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermide morfoloogiline analüüs. Graafikul toodud vastavate morfoloogiliste defektide esinemissagedus vaadeldud permidest. Hinnati tsütoplasma tilgakese esinemist (puudu, väike, suur); saba asendit (sirge, proksimaalselt või distaalselt paindunud) ja häireid pea-osas (juuksenõelana, ebanormaalse kujuga). \*\*  $p < 0,01$ .

### 3.1.4.5.2. Spermi kromatiini struktuuri analüüs – SCSA

Hindamaks RIC8 puuduse mõju spermi kromatiini struktuurile ning fragmentatsioonile viidi läbi SCSA analüüs. Ebaküpsete ja mittetäieliku kromatiini kondensatsiooniga spermide hulka kirjeldab HDS (*high DNA stainable*), DFI (*DNA fragmentation index*) iseloomustab fagmenteerunud DNA-ga spermide osakaalu (Bungum jt., 2004). Igast proovist analüüsiti  $10^4$  spermi. Samas vanuses (3-5 kuud) olevate hiirte spermide kromatiini kondensatsiooni taset iseloomustava HDS (joonis 15B, sinine) protsendiliste tulemuste vahel olulisi erinevusi *wt* ( $n=7$ ) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ( $n=7$ ) ei olnud (HDS keskmine osakaal oli vastavalt 0,73% ja 0,64%). Uuritud isendite fragmentatsiooni analüüsist selgus (Joonis 16B punane), et võrreldes *wt* hiirte spermidega oli *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isenditel oluliselt suurenenud fagmenteerunud spermide hulk. Katseloomade keskmine fagmenteerunud spermide osakaal oli *wt* 5,0 % ja *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>*

7,0%. Y-teljel peapopulatsioonist kõrgemal asuvad rakud moodustavad HDS rühma, DFI moodustavad rakud, mis ei kuulu HDS- ega peapopulatsiooni hulka (joonis 16A).



Joonis 16. **Spermi kromatiini struktuuri analüüs *Wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermidele.** (A) Näide erinevate populatsioonide paiknemisest: enamus rakkudest moodustavad peapopulatsiooni (lilla nooleots). Punase nooleotsaga on tähistatud prügi. HDS% rühma moodustavad rakud asuvad Y-teljel peapopulatsiooni rakkudest kõrgemal (kollane nooleots). Kõik rakud, mis ei kuulu peapopulatsiooni ega HDS-ide hulka, on fragmenteerunud DNA-ga spermid (sinine nooleots). (B) Samas vanuses (3-5 kuud) olevate hiirte spermide kromatiini ebaküpse kondensatsiooni taset iseloomustava HDS (*high DNA stainable*) (joonis16 B, sinine) protsendiliste tulemuste vahel olulisi erinevusi *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* ei olnud. Uuritud *wt* (n=7) ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* (n=7) hiirte spermides oli HDS keskmine osakaal vastavalt 0,73% ja 0,64%. Fragmentatsiooni analüüsist selgus (joonis 16B, punane), et võrreldes *wt* hiirte spermidega oli *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isenditel oluliselt suurenenud fragmenteerunud spermide hulk. Uuritud seitsme isendi keskmine fragmenteerunud spermide osakaal oli *wt* 5,0 % ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* 7,0 %.

## ARUTELU

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli uurida RIC8 rolli hiirte spermatogeneesis ja tuvastada RIC8 osalust hiirte viljakuses. Selleks tekitati antud töö raames *Ric8* konditsionaalne *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiireliin, kus *Ric8* on välja lülitatud spetsiifiliselt arenevates sugurakkudes (alates P3 spermatogoonidest) kasutades (cre-lox) süsteemi. Cre-rekombinaasi ekspresseeriva liinina kasutati *Stra8* promootori kontrolli all olevat *Stra8Cre* (FVB-Tg(*Stra8-icre*)1Reb/LguJ; Jackson Laboratory) transgeenset hiireliini, mille isasugurakkude spetsiifilist ekspressiooni kontrolliti LacZ *knock-in* reporterliiniga. *Stra8Cre* transgeeni ekspressioonis märgatavaid kõrvalekaldeid võrreldes varasemalt avaldatud töödega (Sadate-Ngatchou jt., 2008) ei esinenud, ehkki antud magistritöös anti mõnevõrra detailsem *Stra8Cre* ekspressiooni kirjeldus P3 väänilistes seemnetorukestes. Varasemalt oli teada, et uuritav valk RIC8 lokaliseerub nii arenevate gonotsüütide (E13.5) kui spermatogoonide (P3) tsütoplasmas ning ka hilisemas arengus spermatotsüütide ja spermatiidide tsütoplasmas. Küpsetes spermides on RIC8 ekspressioon vaadeldav nii spermi akrosomaalpiirkonnas kui vaheosas (Pert, 2012). Seega *Stra8Cre* transgeeni tulemused kinnitasid, et *Stra8Cre* loomad on sobilikud *Ric8* välja lülitamiseks postnataalsest spermatogeneesist.

Isaste *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade analüüsimisel selgus, et nii genoomse DNA tasemel, mRNA tasemel kui ka valgu tasemel oli toimunud *Ric8/RIC8* välja lülitamine arenevatest isassugurakkudest ning spermidest. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomad olid võimelised sündima ja olid vitaalsed ning ei omanud märgatavaid anatoomilisi/morfoloogilisi defekte fenotüübis. Järgnevalt uuriti kas nad on paaritumis-ja viljastamisvõimelised. Katse tulemustest selgus, et ehkki *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isased suutsid kopuleeruda ning viljastada küllaltki edukalt *wt* emaseid hiiri, oli vanemate 9-11 kuuste isaste *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade järglaskonna keskmine suurus oluliselt väiksem kui *wt* isaste omal (vastavalt 5,7 ja 7,7 poega pesakonnas). Samas nooremad *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isased omasid *wt* isastega sarnasemaid pesakonna suurusi. Viljakuse hindamise katses tuli välja, et *wt* isased produtseerisid mõnevõrra üllatuslikult vähe vaginaalseid limakorke (edukas kopulatsioon) ja nõ. tühjasid „tiinuseid“ st. munarakke ei viljastatud. Seda võiks seletada asjaoluga, et nii nagu *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomad on ka *wt* loomad tugeva inbriidingu surve all mistõttu võib teatavaid raskusi olla ka viljakuses. *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade järglaste seas

esines ka mõningast perinataalset ja embrüonaalset letaalsust. Embrüonaalselt vanuses E10.5 esinesid *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* osadel järglastel mitmed arenguhäired, mis viitasid eelkõige neuraalsetele defektidele, mis oma olemuselt sarnanevad *NestinCre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiire (*Ric8* välja lülitatud neutraalsetest eellasrakkudest) embrüotele (Kask jt., 2015). Analüüsides *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade järglasi mõni päev peale kopulatsiooni (E3.5), selgus, et küllaltki palju esineb viljastamata munarakke ja embrüod on mõnevõrra arengust maha jäänud võrreldes *wt* isaste järglastega. Võib spekuloida, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermid on mõnevõrra aeglasemad või muutunud liikumisstrateegiatega (hüperaktiivsus, lineaarne liikumine jmt.), mistõttu viljastumine on väikese ajalise nihkega võrreldes *wt* isastega ja see võib ka põhjus olla miks on palju viljastamata munarakke. Sellele annaks kindlasti täpsema vastuse CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*) analüüs, mis on peatselt Sirje Lulla doktoritöö raames valmimas. Spermide morfoloogiline analüüs näitas, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermide seas on võrreldes *wt* loomadega oluliselt vähenenud normaalsete sirge sabaga spermide osakaal. Samas on suurenenud proportsionaalselt distaalse sabakumerusega spermide hulk, mis võib mõju avaldada viljakuse langusele (Kawai jt., 2006). Lisaks oli *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte spermide seas mõnevõrra rohkem tsütoplasmatilgakestega (väike ja suur) sperme. Varasemalt on näidatud, et kõrgema tsütoplasmatilgakestega spermide protsendiga kaasneb madalam viljakus (Kawai jt., 2006; Ozkosem jt., 2015). Suurte fagotsüteerimata tsütoplasmatilgakeste kõrge osakaal üldiselt normaalste morfoloogiatega spermidel viitab kõrvalekaldele normaalsest spermatsioonist ja on tingitud epidümaalse epiteeli funktsioonide häirumisest. Samuti on leitud positiivne seos kõrgema ROS'ide taseme ja tsütoplasmatilgakestega spermide hulga vahel (Said jt., 2005; O'Donnell jt., 2011; Ozkosem jt., 2015).

*Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade spermidel hinnati ka DNA fragmentatsiooni (SCSA meetodil). SCSA meetod aitab näiteks hinnata meeste spermide poolt põhjustatud madalamat blastotsüstide teket ja ebaeduka raseduse riske. Seda kasutatakse sageli viljakusravi – IVF (*In vitro fertilisation*) ja ICSI (*Intracytoplasmic Sperm Injection*) teostamisel täiendava info saamiseks. Spermides paiknevat DNA-d võivad kahjustada spermiogeneesi aset leidvad kromatiini remodelleerimisel tehtavad vead, apoptoos ja ka spermiogeneesi käigus tehtavate ahelate katkete parandamata jätmine ning vabad hapniku radikaalid. Kõik need võivad lõpptulemusel põhjustada DNA fragmentatsiooni (Meyer-Ficca, 2009; García-Ferreira, 2015).  $G\alpha_i$  ja  $G\alpha_o$  peetakse oksüdatiivse stressi sihtmärkideks ja kuna RIC8 üheks ülesandeks on toimida G-valkudes guaniini

nukleotiidivahetusfaktorina (Tall jt. 2004), võib antud valgu puudus uutitava hiireliini spermatogoonides tõsta ROS'ide osakaalu nende spermides. ROS'ide poolt põhjustatavad katked DNA-s põhjendaksid spermide kromatiini analüüsil saadud tulemusi kontrollrühmast uuritava hiireliini *Stra8Cre/Ric8<sup>-/-</sup>* spermides esinenud kõrgemast fragmenteerunud spermide osakaalu kirjeldavast DFI tasemest. Kuigi me töö käigus isaseid hiiri ei kaalunud, täheldasime mõnede *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isaste puhul oluliselt suuremat keharasva osakaalu võrreldes *wt* isenditega. See on levinud tunnuseks kõrge ROS osakaaluga isaste 4-8 nädlastele järglastele (Lane jt., 2014). Võrreldes *wt* hiirte spermidega oli fragmenteerunud DNA-ga spermide protsent *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiireliini puhul mõnevõrra kõrgem. Organismi vananemisel on oluline roll spermide kvaliteedile. Alates 40-aastates meeste puhul on leitud positiivne seos vanuse ja DNA fragmentatsiooni vahel. Üle 50-aastastel meestel on normaalse morfoloogiaga spermide hulk väiksem kui alla 40-aastastel (García-Ferreira, 2015). Meeste puhul on näidatud, et kui DFI (DNA *fragmentation index*) on üle 30%, siis see tõstab blastotsüstide arengu riski (Virro jt., 2004). Lisaks võrreldi *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isendite spermide ebaküpsete ja mittetäieliku kromatiini kondensatsiooni (Bungum jt., 2004) iseloomustavat HDS (*high DNA stainable*) protsenti. Erinevusi nende saadud tulemuste põhjal *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isendite spermides ei esinenud.

Selleks saada täiendavat ülevaadet RIC8 funktsiooni kohta spermatogeneesis analüüsiti lähemalt *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testiseid võrrelduna *wt* testistega. Oluline erinevus mitmete defektsete vääniliste seemnetorukeste esinemine *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testistes. Need defektid oma fenotüübilt (nt. nekrootilised torukesed, spermatogeense epiteeli rakkude sattumine luumenisse) sarnanevad defektidele, mida seostatakse üldiselt Sertoli rakkude häiretega, isassugurakkude arengudefektidega, veresoonkonna ning hormonaalsete häiretega (Creasy jt., 2012). Oluline tulemus oli antud töös ka see, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testistes esinesid basaalmembraani intaktsuse häired, mida on varasemalt näidatud ka teistes *Ric8* mutantsetes mudelites (Kask jt. 2015; Tõnissoo jt., 2011). Ehkki, antud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade puhul oli *Ric8* välja lülitatud spermatogeense epiteeli rakkudest (v.a Sertoli rakkudest), siis täpne defektide põhjus on teadmata. Huvitav oleks edaspidi uurida *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomadel hormoonide (testosteroon, inhibiin, FSF, LH) taset, mis võib heita neile defektidele valgust.

Kuna varasemalt on teada, et RIC8 on oluline faktor rakkude asümmeetrilise/sümmeetrilise jagunemise juures (Miller ja Rand, 2000; Afshar jt., 2004; Couwenbergs jt., 2004; Afshar jt.,

2005; David jt., 2005; Hampoelz jt., 2005; Wang jt., 2005; Woodard jt., 2010), siis võib eeldada, et ka hiire spermatogeneesis esineb RIC8 puudusel mitootilises/meiootilises jagunemises häireid. Näiteks hiire munaraku meioosis sõltub RIC8 lokalisatsioon munarakus meioosi faasist, mistõttu võib sellel valgul eri staadiumitel erinev roll olla (Saare jt., 2015). Antud töös hinnati mitootiliste rakkude hulka *wt* ja *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade väänilistes seemnetorukestes kahes vanuserühmas: P7 ja täiskasvanud. Nooremas vanusegrupis oli statistiliselt oluliselt rohkem mitootilisi rakke *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* isendites. Täiskasvanud loomade puhul tuvastati sarnane olukord, aga statistilist erinevust ei esinenud. Üks põhjus statistilise olulisuse puudumiseks täiskasvanud hiirte puhul võib olla erineva loendamis-meetodi kasutamisest Ph-H3 positiivsete rakkude osakaalu leidmisel. Vanuserühmas P7 loendati väänilises seemnetorukestes olevad kõik rakud (v.a müoidrakud) ning neis olevad Ph-H3 positiivsed rakud. Täiskasvanud loomadel loendati kõik väänilised seemnetorukesed ja neist vähemalt ühte Ph-H3 positiivset rakku sisaldanud vääniliste seemnetorukeste osakaal. Suurenenud Ph-H3 rakkude hulk *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* hiirte testises võib viidata proliferatsiooni tõusule või rakkude pikenenud G2/M faasile (Ritchie jt., 2008; Bagheri-Fam jt., 2011). G2 on interfaasi viimane faas, mille jooksul toimub rakkude kasvamine. G2 kontroll-mehhanismid kontrollivad valmisolekut rakkude jagunemise – mitoosi (M) faasiks. Koekultuuri katsed imetaja rakkudes on näidanud, et *Ric8* puudusel on ka mitoosifaas aeglasem ja pikem (Woodard jt., 2010).

Lisaks leiti antud töös, et *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testistes ja spermides on RIC8 peamise seondumispartneri *Gai1/2* (Tall jt., 2004) tase vähenenud. Samas on huvitaval kombel *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* teatistes Leydigi rakkudes *Gai1/2* tase oluliselt tõusnud. Samuti on ka RIC8 ekspressioon tõusnud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade Leydigi rakkudes. Täpne põhjus on teadmata, kuid võib pakkuda, et mingi signalisatsiooni tagaside mehhanismi mõjul tõstetakse kompensatoorselt vastavate valkude ekspressiooni Leydigi rakkudes kuna spermatogeenses epiteelis on RIC8 tase maas.



## KOKKUVÕTE

Antud magistritöös uuriti guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8 rolli spermatogeneesis ja mõju hiirte viljakusele. Selleks tekitati spermatogoonide spetsiifiline konditsionaalne *Ric8 knock-out* hiireliin *Stra8CreRic8<sup>-/-</sup>* ning analüüsiti hiireliini isaste hiirte viljakust, testiste ja spermide morfoloogiat ning nende järglaste fenotüüpe.

Töö tulemusena näidati, et:

- Sugurakkude spetsiifilise konditsionaalse *Ric8 knock-out* hiireliini *Stra8CreRic8<sup>-/-</sup>* isendid on elujõulised ja sigimisvõimelised. Noored (3-5 kuud) *Stra8CreRic8<sup>-/-</sup>* isased on *wt* hiirtega võrdse viljakusega. Vanemate (9-11 kuud) *Stra8CreRic8<sup>-/-</sup>* isaste hiirte järglaste arv on oluliselt madalam kui sama vanadel *wt* hiirtel.
- Ric-8 väljalülitamine *Stra8Cre* hiirte spermides tekitab häireid testiste morfoloogias ja suurendab fragmenteerunud spermide osakaalu.
- Täiskasvanud *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* loomade testistes paiknevate vääniliste seemnetorukeste basaalmembraani intaktsus on häirunud.
- P7 vanuste *Stra8Cre<sup>-/-</sup>;Ric8* isendite testistes on mitootiliste rakkude osakaal kõrgem võrreldes *Stra8Cre<sup>+/-</sup>;Ric8* hiirtega.
- Spermatogoonide spetsiifilise konditsionaalse *knock-out* hiireliini tekitamiseks mõeldud transgeenne Cre-hiireliin *Stra8Cre* on spermatogeneesi uurimiseks sobilik.

## **The role of RIC8 in spermatogenesis and the generation of sperm cell specific conditional *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* mouse strain**

Lilian Leis

### **SUMMARY**

RIC-8 is a chaperon and a guanine exchange factor for a subset of G-proteins. It is widely studied in *C.elegans* and *D.melanogaster* but a lot still needs to be learnt about its role in different developmental and cellular processes in mammals.

The aim of this study was to identify the role of RIC8 in mouse spermatogenesis and its potential influence on male fertility. RIC8 deficiency is embryonically lethal and to study the functions of RIC8 in mouse spermatogenesis a spermatogonial-specific transgenic mouse model *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* was generated. This study revealed some abnormalities in sperm motility and testis morphology caused by RIC8 deficiency. Some seminiferous tubules of adult transgenic mice had epithelial cell mass in lumen, basement membrane was defective, and at P7 the seminiferous tubules contained more mitotic cells. The content of sperm cells with residual body and fragmented DNA was higher in *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* mice. Although RIC8 deficiency in spermatogonium and sperm cells did not cause male infertility, it appeared to be important for normal spermatogenesis and the function of seminiferous tubules.

## TÄNUSÕNAD

Täna prof. Margus Pooga't. Samuti juhendajaid Tambet Tõnissoo'd ja Riho Meier'it toetamise, töösse panustamise ja laialdaste teadmiste jagamise eest! Spermide morfoloogilise analüüsi teostamisel juhendamise eest tänan Ants Kavak'ut (EMÜ). Igale probleemile lahenduste otsimise, toreda seltskonna ja huvitavate vestluste eest lähevad tänusõnad Sirje Lulla'le, Keiu Kask'le ja Katrin Ruisu'le. Samuti tänan kõiki teisi kolleege TÜ MRI Arengubioloogia õppetoolist.

## KIRJANDUSE LOETELU

**Afshar K, Willard FS, Colombo K, Siderovski DP ja Gönczy P** (2005) Cortical localization of the Galpha protein GPA-16 requires RIC-8 function during *C. elegans* asymmetric cell division. *Development (Cambridge, England)* **132** 4449–4459.

**Aitken RJ, De Iuliis GN, Finnie JM, Hedges A ja McLachlan RI** (2010) Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction (Oxford, England)* **25** 2415–2426.

**Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG, van Pelt AMM ja Page DC** (2008) Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105** 14976–14980.

**Armstrong JS, Rajasekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom W. ja Sikka SC** (1999) Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine* **26** 869–880.

**Arnheim N ja Calabrese P** (2009) Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations *Nature Reviews Genetics* **10**, 478-488.

**Bagheri-Fam S, Argentaro A, Svingen T, Combes AN, Sinclair AH, Koopman P ja Harley VR** (2011) Defective survival of proliferating Sertoli cells and androgen receptor function in a mouse model of the ATR-X syndrome. *Human Molecular Genetics* **20** 2213–2224.

**Bao J, Ma HY, Schuster A, Lin YM ja Yan W** (2013) Incomplete cre-mediated excision leads to phenotypic differences between Stra8-iCre; Mov10l1(lox/lox) and Stra8-iCre; Mov10l1(lox/Δ) mice. *Genesis* **7** 481–490.

- Baxendale RW ja Fraser LR** (2003) Immunolocalization of multiple Galpha subunits in mammalian spermatozoa and additional evidence for Galphas. *Molecular Reproduction and Development* **65** 104–113.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM and O'Bryan MK** (2010) Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a “non-performer”. *Human Reproduction Update* **16** 205–224.
- Bullejos M ja Koopman P** (2005) Delayed Sry and Sox9 expression in developing mouse gonads underlies B6-Y(DOM) sex reversal. *Developmental Biology* **278** 473–481.
- Bungum M, Humaidan P, Spano M, Jepson K, Bungum L ja Giwercman a** (2004) The predictive value of sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters for the outcome of intrauterine insemination, IVF and ICSI. *Human Reproduction (Oxford, England)* **19** 1401–1408.
- Cao W, Aghajanian HK, Haig-Ladewig L ja Gerton GL** (2009) Sorbitol can fuel mouse sperm motility and protein tyrosine phosphorylation via sorbitol dehydrogenase. *Biology of Reproduction* **80** 124–133.
- Creasy D, Bube A, de Rijk E, Kandori H, Kuwahara M, Masson R, Nolte T, Reams R, Regan K, Rehm S et al.** (2012) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic Pathology* **40** 40S–121S.
- Celec Peter OD ja HJ** (2015) On the effects of testosterone on brain behavioral functions. *Frontiers in Neuroscience* **9** 1–17.
- Chan P, Gabay M, Wright F ja Tall GG** (2011) Ric-8B is a GTP-dependent G protein alphas guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry* **286** 19932–19942.
- Chan P, Thomas CJ, Sprang SR ja Tall GG** (2013) Molecular chaperoning function of Ric-8 is to fold nascent heterotrimeric G protein  $\alpha$  subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **25** 3794–9.

- Chemes HE ja Alvarez Sedo C** (2012) Tales of the tail and sperm head aches: changing concepts on the prognostic significance of sperm pathologies affecting the head, neck and tail. *Asian Journal of Andrology* **14** 14–23.
- Das PJ, McCarthy F, Vishnoi M, Paria N, Gresham C, Li G, Kachroo P, Sudderth a K, Teague S ja Love CC** (2013) Stallion sperm transcriptome comprises functionally coherent coding and regulatory RNAs as revealed by microarray analysis and RNA-seq. *PloS One* **8** e56535.
- Davidoff MS, Breucker H, Holstein AF ja Seidl K** (1990) Cellular architecture of the lamina propria of human seminiferous tubules *Cell Tissue Res* 262, 253–261.
- De Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H ja Gagnon C** (1997) Reactive oxygen species and sperm physiology *Reviews of reproductions* **1** 48–54.
- De Rooij DG ja Mizrak SC** (2008) Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development (Cambridge, England)* **135** 2207–2213.
- De Rooij DG ja Russell LD** (2000) All You Wanted to Know About Spermatogonia but Were Afraid to Ask. **6512** 776–798.
- Díez-Sánchez C, Ruiz-Pesini E, Montoya J, Pérez-Martos A, Enríquez JA ja López-Pérez MJ** (2003) Mitochondria from ejaculated human spermatozoa do not synthesize proteins. *FEBS Letters* **553** 205–208.
- Díez-Torre A, Silván U, Moreno P, Gumucio J ja Aréchaga J** (2011) Peritubular myoid cell-derived factors and its potential role in the progression of testicular germ cell tumours. *International Journal of Andrology* **34** e252–64.
- Dröge W** (2005) Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* **360** 2355–2372.

- Evenson D ja Jost L** (2000) Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods in cell science* **189** 169–189.
- Falender AE, Freiman RN, Geles KG, Lo KC, Hwang K, Lamb DJ, Morris PL, Tjian R ja Richards JS** (2005) Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b , a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes & Development* **19** 794–803.
- Fan YS, Hu YJ ja Yang WX** (2012) TGF- $\beta$  superfamily: how does it regulate testis development. *Molecular Biology Reports* **39** 4727–4741.
- Ferramosca A ja Zara V** (2014) Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. *BioMed Research International* **2014** 902953.
- França LR, Avelar GF ja Almeida FFL** (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* **63** 300–318.
- García-Ferreira J** (2015) Sperm DNA Fragmentation and Its Relation With Fertility. *New Discoveries in Embryology* **18** 3–18.
- Garratt, M. ja Brooks RC** (2012). "Oxidative stress and condition-dependent sexual signals: more than just seeing red." *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **279** 3121-3130.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A ja Remohi J.** (2004) Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology* **6** 59-65.
- Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW ja Stefan Andersson** (1994) Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17  $\beta$ –hydroxysteroid dehydrogenase 3 *Nature Genetics* **7** 34 – 39.
- Goodson SG, Zhang Z, Tsuruta JK, Wang W ja O'Brien D a** (2011) Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of Reproduction* **84** 1207–1215.

- Griswold MD ja McLean D** (2006) *The Sertoli cell. Physiology of Reproduction, 3 edition.* Elsevier, San Diego, CA.
- Hacker A, Capel B, Goodfellow P. ja Lovell-Badge R** (1995) Expression of Sry, the mouse sex determining gene. *Development* **121**1603– 1614.
- Holsberger DR ja Cooke PS** (2005) Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell and Tissue Research* **322** 133–140.
- Hutson JM, Nation T, Balic ja Southwell BR** (2009) The role of the gubernaculum in the descent and undescend of the testis. *Therapeutic Advances in Urology* **1** 115–121.
- Jiang Z, Zhang X, Deka R ja Jin L** (2005) Genome amplification of single sperm using multiple displacement amplification. *Nucleic Acids Research* **33** e91.
- Jiang XH, Bukhari I, Zheng W, Yin S, Wang Z, Cooke HJ ja Shi QH** (2014) Blood-testis barrier and spermatogenesis: lessons from genetically-modified mice. *Asian Journal of Andrology* **16** 572–580.
- Johnson L**, (1986) Spermatogenesis and Ageing in the human. *Journal of Andrology* **7** 331-351.
- Karl J ja Capel B** (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology* **203** 323–333.
- Kask K, Ruisu K, Tikker L, Karis K, Saare M, Meier R, Karis A, Tõnissoo T ja Pooga M** (2015) Deletion of RIC8A in neural precursor cells leads to altered neurogenesis and neonatal lethality of mouse. *Developmental Neurobiology* **75** 1–19.
- Kawai Y, Hata T, Suzuki O and Matsuda J** (2006) The Relationship between Sperm Morphology and In Vitro Fertilization Ability in Mice. *Journal of Reproduction and Development* **52** 561–568.



- Klonisch T, Fowler P a and Hombach-Klonisch S** (2004) Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. *Developmental Biology* **270** 1–18.
- Kobayashi T, Kaneko T., Iuchi Y, Matsuki S., Takahashi M., Sasagawa I., Nakada T. ja Fujii J** (2002) Localization and physiological implication of aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in reproductive tracts and spermatozoa of male rats *Journal of Andrology.*, **23** 674–683
- Krawetz SA** (2005) Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nature Review Genetics* **6** 633–642.
- Kumar A, Shekhar S ja Dhole B** (2014) Thyroid and male reproduction. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism* **18** 23–31.
- Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, Sandeman L, Kang WX ja Zander-Fox DL** (2014) Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. *PloS One* **9** e100832.
- Leevik M** (2016) RIC8 funktsiooni uurimine spermatogeneesis, kasutades mudelina isassugurakkude spetsiifilist *Stra8CreRic8<sup>-/-</sup>* hiireliini. Bakalaureusetöö
- Li H, Palczewski K, Baehr W ja Clagett-Dame M** (2011) Vitamin A deficiency results in meiotic failure and accumulation of undifferentiated spermatogonia in prepubertal mouse testis. *Biology of Reproduction* **84** 336–341.
- Lowe X, Eskenazi B, Nelson DO, Kidd S, Alme A ja Wyrobek a J** (2001) Frequency of XY sperm increases with age in fathers of boys with Klinefelter syndrome. *American Journal of Human Genetics* **69** 1046–1054.
- Loveland K, Schlatt S, Sasaki T, Chu M, Timpl R ja Dziadek M** (1998) Developmental Changes in the Basement Membrane of the Normal and Hypothyroid Postnatal Rat Testis : Segmental Localization of Fibulin-2 and Fibronectin **1130** 1123–1130.

- Ma S, Kwon HJ ja Huang Z** (2012) Ric-8a, a guanine nucleotide exchange factor for heterotrimeric G proteins, regulates bergmann glia-basement membrane adhesion during cerebellar foliation. *J Neurosci* 32:14979–14993.
- Malbon CC** (2005) G proteins in development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 689–701.
- Mazaud-Guittot S, Meugnier E, Pesenti S, Wu X, Vidal H, Gow a ja Le Magueresse-Battistoni B** (2010) Claudin 11 deficiency in mice results in loss of the Sertoli cell epithelial phenotype in the testis. *Biology of Reproduction* 82 202–213.
- McLean, D.J., Friel, P.J., Johnston, D.S., ja Griswold, M.D** (2003). Characterization of spermatogonial stem cell maturation and differentiation in neonatal mice. *Biol. Reprod.*
- Medrano A, Fernández-Novell JM, Ramió L, Alvarez J, Goldberg E, Montserrat Rivera M, Guinovart JJ, Rigau T ja Rodríguez-Gil JE** (2006) Utilization of citrate and lactate through a lactate dehydrogenase and ATP-regulated pathway in boar spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 73 369–378.
- Menkveld R, El-garem Y, Schill W ja Henkel R** (2003) Relationship Between Human Sperm Morphology and Acrosomal Function. 20 432–438.
- Merchant-Larios H ja Moreno-Mendoza N** (2001) Onset of Sex Differentiation : Dialog Between Genes and Cells. 32 553–558.
- Merlet F, Weinstein LS, Goldsmith PK, Rarick T, Hall JL, Bisson J ja Mazancourt P De** (1999) Identification and localization of G protein subunits in human Franc. 5 38–45.
- Meyer-Ficca ML, Lonchar J, Credidio C, Ihara M, Li Y, Wang Z-Q ja Meyer RG** (2009) Disruption of poly(ADP-ribose) homeostasis affects spermiogenesis and sperm chromatin integrity in mice. *Biology of Reproduction* 81 46–55.

- Migrenne S, Moreau E, Pakarinen P, Dierich A, Merlet J, Habert R ja Racine C** (2012) Mouse testis development and function are differently regulated by follicle-stimulating hormone receptors signaling during fetal and prepubertal life. *PloS One* **7** e53257.
- Miller KG ja Rand JB** (2000) Centrosome Movements During Early Embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. **8**.
- Miller KG, Alfonsott A, Nguyen M, Crowell JA, Johnson CD ja Rand JB** (1996) A genetic selection for *Caenorhabditis elegans* synaptic transmission mutants. **93** 12593–12598.
- Miller KG, Emerson MD, Mcmanus JR ja Rand JB** (2000) RIC-8 ( Synembryn ): A Novel Conserved Protein that Is Required for G q  $\square$  Signaling in the *C. elegans* Nervous System. **27** 289–299.
- Miyamoto** (2002) Isolation and expression analysis of the testis-specific gene, STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **19** 531–535.
- Munsterberg A ja Lovell-badge R** (1991) Expression of the mouse anti-Mullerian hormone gene suggests a role in both male and female sexual differentiation. *Development* **624** 613–624.
- Nef S ja Parada L** (2000) Hormones in male sexual development. *Genes & Development* **14** 3075–3086.
- Nel-Themaat L, Gonzalez G, Akiyama H ja Behringer RR** (2010) Illuminating testis morphogenesis in the mouse. *Journal of Andrology* **31** 5–10.
- Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H ja Genistein LY** 2000 Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species *Nature* **408**, 492-495.
- Noormets K, Kõks S, Kavak A, Arend A, Aunapuu M, Keldrimaa A, Vasar E ja Tillmann V** (2009) Male mice with deleted Wolframin (Wfs1) gene have reduced fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology* **7** 8

- O'Shaughnessy, P. J., Baker, P., Sohnius, U., Haavisto, A.-M., Charlton, H. M. ja Huhtaniemi, I.** (1998). Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology* **139**, 1141-1146.
- O'Donnell L., Nicholls P.K., O'Bryan M.K., McLachlan R.I. & Stanton P.G.** (2011) Spermiation: The process of sperm release. *Spermatogenesis*; **1** 14-35.
- Ohta H, Yomogida K, Dohmae K ja Nishimune Y** (2000) Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells : the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* **127** 2125–2131.
- Oldham WM, Eps N Van, Preininger AM, Hubbell WL ja Hamm HE** (2007) Mapping allosteric connections from the receptor to the nucleotide-binding pocket of heterotrimeric G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **19** 7927-32.
- Oliva R;** (2006) Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* **12** 417-435.
- Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P ja Krawetz SA** (2002) Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* **360** 772–777.
- Ozkosem B, Feinstein SI, Fisher AB ja O'Flaherty C** (2015) Advancing age increases sperm chromatin damage and impairs fertility in peroxiredoxin 6 null mice. *Redox Biology* **5** 15–23.
- Oulad-abdelghani M, Bouillet P, Dcimo D, Gansmuller A ja Heyberger S** (1996) Characterization of a Premeiotic Germ Cell-specific Cytoplasmic Protein Encoded by Stra8, a Novel Retinoic Acid-responsive Gene. **135** 469–477.
- Paul C ja Robaire B** (2013) Impaired function of the blood-testis barrier during aging is preceded by a decline in cell adhesion proteins and GTPases. *PloS One* **8** 1-10.
- Pert R** (2012) Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 lokalisatsioon hiire ja inimese spermatogeneesis ja idutee- spetsiifilise *VasaCreRic8*<sup>-/-</sup> konditsionaalse *knock-out* hiireliini tekitamine ning analüüs. Magistritöö

- Rainey M a, George M, Ying G, Akakura R, Burgess DJ, Siefker E, Bargar T, Doglio L, Crawford SE ja Todd GL** (2010) The endocytic recycling regulator EHD1 is essential for spermatogenesis and male fertility in mice. *BMC Developmental Biology* **10** 37.
- Rebourcet D, O'Shaughnessy PJ, Pitetti JL, Monteiro A, O'Hara L, Milne L, Tsai YT, Cruickshanks L, Riethmacher D, Guillou F, Mitchell RT, van 't Hof R, Freeman TC, Serge Nef S ja Smith LB** (2014) Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis *Development* **141** 2139–2149.
- Saare M, Lulla S, Tõnissoo T, Meier R, Kask K, Ruisu K, Karis A, Salumets A and Pooga M** (2015) Expression Pattern and Localization Dynamics of Guanine Nucleotide Exchange Factor RIC8 during Mouse Oogenesis. *PloS One* **10** e0129131.
- Ritchie K, Seah C, Moulin J, Isaac C, Dick F ja Bérubé NG** (2008) Loss of ATRX leads to chromosome cohesion and congression defects. *The Journal of Cell Biology* **180** 315–324.
- Romano F, Tripiciano A, Muciaccia B, De Cesaris P, Ziparo E, Palombi F ja Filippini A** (2005) The contractile phenotype of peritubular smooth muscle cells is locally controlled: possible implications in male fertility *Contraception* 2005 **4** 294-297.
- Rosenbaum DM, Rasmussen SGF ja Kobilka BK** (2009) The structure and function of G-protein-coupled receptors *Nature*. 2009 459 356–363
- Ruisu K, Kask K, Meier R, Saare M, Raid R, Veraksitš A, Karis A, Tõnissoo T ja Pooga M** (2013) Ablation of RIC8A function in mouse neurons leads to a severe neuromuscular phenotype and postnatal death. *PloS One* **8** e74031.
- Russell L.** Observations on rat Sertoli ectoplasmic ('junctional') specializations in their association with germ cells of the rat testis. (1977) *Tissue Cell*. **9** 475–498

**Russell L.** Role in spermiation. (1993) *The Sertoli cell*. Clearwater Cache River Press, 269–302.

**Sada A, Suzuki A, Suzuki H ja Saga Y** (2009) The RNA-binding protein NANOS<sub>2</sub> is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science* **325** 1394–1398.

**Sadate-Ngatchou PI, Payne CJ, Dearth AT ja Braun RE** (2008) Cre recombinase activity specific to postnatal, premeiotic male germ cells in transgenic mice *Genesis* **46** 738-42.

**Said TM, Agarwal A, Sharma RK, Thomas AJ jr. aa Sikka SC.** (2005) Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by beta-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate. *Fertil Steril*; 83:95-103.

**Sharpe RM, Mckinnell C, Kivlin C ja Fisher JS** (2003) Review Proliferation and functional maturation of Sertoli cells , and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* **6** 769–784.

**Sharpe RM, Walker M, Millar MR, Atanassova N, Morris K, McKinnell C, Saunders PTK ja Fraser HM** (2000) Effect of neonatal gonadotropin-releasing hormone antagonist administration on Sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. *Biology of Reproduction* **62** 1685–1693.

**Simorangkir DR, Marshall GR ja Plant TM** (2003) Sertoli cell proliferation during prepubertal development in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) is maximal during infancy when gonadotropin secretion is robust. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **88** 4984–4989.

**Skinner MK, Tung PS ja Fritz IB** (1985) Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *Journal of Cell Biology* **100** 1941–1947.

**Stukenborg J-B, Kjartansdóttir KR, Reda A, Colon E, Albersmeier JP and Söder O** (2014) Male germ cell development in humans. *Hormone Research in Pediatrics* **81** 2–12.

- Suryawanshi AR, Khan SA., Joshi CS. ja Khole VV** (2012) Epididymosome-Mediated Acquisition of MMSDH, an Androgen-Dependent and Developmentally Regulated Epididymal Sperm Protein *Journal of Andrology* **5** 963–974
- Zhou X** (2010) Roles of androgen receptor in male and female reproduction: lessons from global and cell-specific androgen receptor knockout (ARKO) mice. *Journal of Andrology* **31** 235–243.
- Tall GG, Krumins AM ja Gilman AG** (2003) Mammalian Ric-8A (synembryn) is a heterotrimeric G $\alpha$  protein guanine nucleotide exchange factor. *The Journal of Biological Chemistry* **278** 8356–8362.
- Tall GG, Gilman AG** (2004) Purification and functional analysis of Ric-8A: a guanine nucleotide exchange factor for G-protein alpha subunits. *Methods Enzymol* 390: 377-388
- Tilmann C ja Capel B** (1999) Mesonephric cell migration induces testis cord formation and Sertoli cell differentiation in the mammalian gonad. **2890** 2883–2890.
- Tremellen K** (2008) Oxidative stress and male infertility — a clinical perspective. *Human reproduction update* **14** 243–258.
- Tõnissoo T, Kõks S, Meier R, Raud S, Plaas M, Vasar E ja Karis A** (2006) Heterozygous mice with Ric-8 mutation exhibit impaired spatial memory and decreased anxiety. *Behavioural Brain Research* **167** 42–48.
- Tõnissoo T, Lulla S, Meier R, Saare M, Ruisu K, Pooga M ja Karis A** (2010) Nucleotide exchange factor RIC-8 is indispensable in mammalian early development. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists* **239** 3404–3415.
- Tõnissoo T, Meier R, Talts K, Plaas M, ja Karis A.** (2003) „Expression of ric-8 (synembryn) gene in the nervous system of developing and adult mouse“. *Gene Expression Patterns* 3; **5** 591–594.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M ja Telser J** (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39 44-84.
- Van Pelt MM ja De Rooij DG** (1990) Synchronization of the Replacement Seminiferous in Vitamin Epithelium Mice *Biology of Reproduction* **43** 363–367.
- Van Pelt, De Rooij DG, van der Burg B, van der Saag PT, Gustafsson JÅ ja Kuiper GGM** (1999) Ontogeny of Estrogen Receptor- $\beta$  Expression in Rat Testis *Endocrinology* **140** 478-483.
- Vergouwen** (1991) Proliferative activity of gonocytes , Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of reproduction and fertility* **93** 233-43.
- Vidal F, Sage J, Cuzin F ja Rassoulzadegan M** (1998) Cre expression in primary spermatocytes: a tool for genetic engineering of the germ line. *Molecular Reproduction and Development* **51** 274–280.
- Virro MR, Kjersten L, Larson-Cook KL ja Evenson DP** (2004) Sperm chromatin structure assay (SCSA) parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles *Fertility and sterility* **5** 1289-1295.
- Visconti PE, Bailey JL, Moore GD, Pan D, Olds-clarke P ja Kopf GS** (1995) Capacitation of mouse spermatozoa I . Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. *Development* **1137** 1129–1137.
- Vogl AW, Pfeiffer DC, Mulholland D, Kimel G ja Guttman J.** (2000) Unique and multifunctional adhesion junctions in the testis: ectoplasmic specializations. *Archives of Histology and Cytology* **63** 1–15.
- Väärtnõu F (2014)** Guaniini nukleotiidivahetusfaktori RIC8A lokalisatsioon ja ekspressioon inimese spermides kapatsitatsiooni protsessis. Magistritöö.



- Walker WH, ja Cheng J** (2005) FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* (Cambridge, England) **130** 15–28.
- Walter CA, Intano GW, McCarrey JR, McMahan CA ja Walter RB** (1998) Mutation frequency declines during spermatogenesis in young mice but increases in old mice. *Genetics* **95** 10015–10019.
- Wang H, Ng KH, Qian H, Siderovski DP, Chia W ja Yu F** (2005) Ric-8 controls Drosophila neural progenitor asymmetric division by regulating heterotrimeric G proteins. *Nature Cell Biology* **7** 1091–1098.
- Welsh M, Moffat L, Belling K, de Franca LR ja Segatelli TM** (2012) Androgen receptor signalling in peritubular myoid cells is essential for normal differentiation and function of adult Leydig cells. *International journal of andrology* **35** 25–40.
- Wettschureck N ja Offermanns S** (2005) Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews* **85** 1159–1204.
- Winters SJ, Wang C, Abdelrahman E, Hadeed V, Dyky MA ja Brufsky A** (2006) Inhibin-B levels in healthy young adult men and prepubertal boys: is obesity the cause for the contemporary decline in sperm count because of fewer Sertoli cells? *Journal of Andrology* **27** 560–564.
- Yao HH, Whoriskey W ja Capel B** (2002). Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes and Development* **16** 1433–1440

## LIHTLITSENTS

### **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina Lilian Leis (sünnikuupäev: 17. mai 1990)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

### **Guaniini nukleotiidivahetusfaktor RIC8 spermatogoonide spetsiifilise *Stra8Cre;Ric8<sup>-/-</sup>* konditsionaalse hiireliini tekitamine ning analüüs,**

mille juhendajad on Tambet Tõnissoo ja Riho Meier

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates 27.05.2019 kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 27.05.2016